

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Inmovilización y aplicación de la lipasa versátil de  
*Ophiostoma piceae* en la síntesis de aromas, nutraceúticos y  
biodiesel**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**María Molina Gutiérrez**

DIRECTORAS

**Alicia Prieto Orzanco**

**María Jesús Martínez Hernández**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

**Inmovilización y aplicación de la lipasa  
versátil de *Ophiostoma piceae* en la síntesis  
de aromas, nutraceuticos y biodiesel**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

**María Molina Gutiérrez**

Directoras

Dra. Alicia Prieto Orzanco

Dra. María Jesús Martínez Hernández

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)



Madrid 2020







*A mi madre y hermanos*

*A mis Yayos*

*A Alberto*



*Da igual. Prueba otra vez. Fracasa otra vez. Fracasa mejor*

*Samuel Beckett*

*Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también  
un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan  
como un cuento de hadas*

*Marie Curie*



## **Agradecimientos**

En primer lugar, quería agradecer al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, donde se ha desarrollado esta tesis doctoral y que ha sido financiada gracias a los proyectos BIO12-36372 y BIO2015-68387-R del MINECO. También, al Departamento de Microbiología III y a la Facultad de Ciencias Biológicas por su dedicación, más aún en tiempos de Covid y confinamiento.

Por supuesto, todo esto no habría sido posible sin la confianza que depositaron en mí un día, hace ya más de 6 años, cuando las doctoras Maria Jesús Martínez y Alicia Prieto, me acogieron para realizar mi trabajo fin de máster. Esos meses de trabajo dieron la semilla que ha fructificado en esta tesis doctoral. Gracias Maria Jesús porque, aún en la distancia y pese a todos tus retos profesionales y personales de los últimos tiempos, siempre tenías un hueco para aportar tu grandísima experiencia y guiarnos.

Me van a permitir que dedique un párrafo completo a mi directora, a mi amiga, a mi familia, a “mi jefa”, la doctora Alicia Prieto. Gracias Ali, por todo, en lo científico nos ha tocado abrir un camino en la selva a machetazos, incomprendidas, pero con el ánimo siempre por bandera, en nuestro rinconcito del 245. Me has enseñado como generar un proyecto casi de la nada y hacerme ver que era capaz de llevarlo a cabo y hacerlo más grande, y por supuesto 1000 cosas más, pero me llevo especialmente esto en confre de oro para mi nueva etapa. En lo personal...no me salen las palabras, hemos compartido tantas cosas buenas y malas, siempre has estado ahí para hablar, apoyar, consolar, animar y arengar. Nuestra hora del té, los dulces en Navidad, la piscina en verano, el congreso de Santander..., muchos recuerdos, pero de ti me llevo, sobretodo, tu estoicismo para afrontar los futuros retos de mi vida.

Gracias también al resto del equipo investigador del grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica, porque antes o después siempre os he molestado a alguno pidiendo consejo y ayuda. Gracias a la Dra. Susana Camarero, el Dr. Javier Ruiz-Dueñas, la Dra. Marta Pérez-Boada, el Dr. Jorge Barriuso (*coffee, coffee...*) y al Dr. Ángel T. Martínez por todos sus consejos y ánimos.

Gracias al servicio de cultivos del CIB, en especial a la Dra. Carmen Doñoro por su ayuda inestimable en esta tesis. Al igual que al grupo del Dr. Felix López (CNIM-CSIC), en especial a Lorena, por su gran trabajo y apoyo, y por sus ánimos (llevais escuchando del fin de esta tesis ni se sabe, pero que conste que la pandemia se coló por medio).

Y como me voy a olvidar de mi segundo laboratorio, cromatografía, con *mi* Leonor y *mi* Mercedes. Muchas gracias por aguantarme, por dejarme trastear y aprender. Por aguantar mi estrés constante y mimarme. No os olvidéis de mi, os quiero mucho.

Mis queridos funguitos, se que me gané vuestro amor con mi tarta de queso, confesad, pero espero haberme ganado vuestro cariño a lo largo de estos años. Empezaré por los que ya no están. Gracias Mariu por molestarte en enseñarme en los momentos más estresantes de tu periodo de doctorado, además, por supuesto de tu amistad, dejaste un vacío muy grande cuando te fuiste, te eché mucho de menos. Jesús, era un gusto hablar contigo, siempre tan alegre, sé que te va de maravilla, has nacido para lo que haces ahora. Vero, la persona más dulce y calmada que he conocido, ojalá pudiera ser un poquito como tú. Señor Manolito, que puedo decir, has salvado esta tesis, gracias por tu paciencia cada vez que te pedía ayuda y por ser tú, inigualable, único. David (Amanolito), nos seguiremos viendo cuando vuelva Zaira a visitarnos, o a quedarse a vivir ya aquí (a ver si le buscamos un trabajo), gracias por tu simpatía y comprensión. Gracias Isa P, porque, aunque tú no lo sepas, tenía un ojo puesto en ti siempre para aprender a como manejar el laboratorio. Lorea

y Cris, menudo duo, que decir, dabais vida no al laboratorio, a todo el centro. Isa V, ausente pero siempre presente, amable y atenta a pesar de casi ni haber coincidido, y Javi, siempre tan cercano. Mi querida Sonia, has elegido un camino que te llevará lejos, eres un amor de persona. Como no mencionar al “rey del laboratorio” Fran, que se hizo dueño y señor del laboratorio (y del centro) nada más llegar, jamás te perdonaré que no vinieras a organizar el 245, me dejaste sólo ante el peligro (llamado David, Pablo e Íñigo). Un pensamiento por todas mis Marias, hay foto de todas juntas y ordenadas por rango de edad, Marta, Anna, Ericc, Jose y mi Albertito, me recordabas tanto a mi hermano que no te puedo más que querer, cuánto me alegro que hayas tenido éxito. A mi compi de rincón Neumara, fue breve pero intenso, espero que te vaya muy bien en tu nueva etapa y con tus niños. Compartimos momentos muy bonitos.

Queridos 248's, no nos hemos cruzado mucho (salvo por la centrífuga), pero siempre habéis estado ahí para echar una mano y enseñar, gracias Iván, Marisa, Meme, Elena (siempre corriendo) y a las nuevas incorporaciones Gonzalo, Rash, Ander y Rocio, y tantos otros estudiantes que han pasado por aquí y de los que no recuerdo más que cosas buenas. Me permitirán una especial atención a Lola, con esa mirada traviesa en los ojos siempre tan brujilla y buscándome casa en Colmenar, por supuesto siempre compinchada con Ana (y sus gatitas), gracias por demostrarme tu amistad, sobre todo en los últimos tiempos, ha significado mucho para mí, siempre recordaré tu mala cabeza para consolarme por la mia. Y que puedo decir de Juan Carro, ¿qué eres una maravillosa persona?, se me queda corto; gracias por las charlas, por los consejos, por quitarle importancia a las cosas tontas que a mí me agobian tanto y dejarme desahogar, te voy a echar de menos.

Un párrafo para Laura (Lidem), porque sí, porque se lo merece, por ser el pilar del laboratorio y la piedra con la que nos rozamos y endurecemos todos los estudiantes (contabilizaba más pasos el día que trabajaba con ella). La única que comprendía mis locuras gatunas, gracias por incluirme en el equipo gatuno,

cuídales y mímales, pese a quien pese, y diles que me he acordado de ellos escribiendo esta tesis.

Y finalmente a los 245's. Vamos a ver, como doy las gracias al equipo terremoto, Íñigo, David y Pablo (actuales 200's). Todos apretaditos en el 245, que insufribles eraís, pero que divertidos, que buenas personas y currantes, ha sido maravilloso sufriros y regañaros ("no si eso ya estaba ahí"). Cuando os fuisteis del laboratorio nada volvió a ser lo mismo, os echaré mucho de menos y siempre os recordaré. Sois mis niños, allá dónde vayáis y pasen los años que pases, asumidlo. Un huequecito para recordar a William, mi brasileño favorito, mi cómplice navideño, que magnífico compañero de laboratorio me regaló la vida el último año. Gran repostero de *brigadeiros*, *beijinho* y anacarditos, por favor, ¡vuelve!, se nos fastidieron los planes de que tu visita coincidiera con esta tesis. Gracias también a los que han estado bajo mi desastrosa ala y me han dejado aprender a enseñar, intenté hacerlo lo mejor que supe, Maria Doina (tan atenta y agradecida), Malina (no nos entendíamos, pero en el fondo me quieres y lo sabes), Mihai (gracias por tu inestimable ayuda) y Carlos (el heredero), mucha suerte en vuestro futuro. Y que puedo decir de mis compis *tésicos*, Juan gracias por el apoyo, por poner seriedad a las cosas, que si no se nos desmadran, y al príncipe del laboratorio, Felipe, gracias por las charlas a última hora de la tarde, por dejarme lanzarte las pelusas del rincón, por tu paciencia infinita, por ser tan buena persona, por tus bizcochos...son tantas cosas, desde el primer día siempre sentía más confianza cuando estabas por el labo.

Gracias a aquellos que me crucé durante todos los años de biología y que de alguna forma han contribuido a que llegara hasta aquí, en especial a Eva y Bárbara, por empujarme hacia lo sobresaliente. Y que puedo decir de *mi* Laura, mi compañera de fatigas, gracias a Dios por tenerte ahí, por compartir nuestras andanzas, que no han acabado, cuando leas estos agradecimientos, acuérdate de nuestras conversaciones de Whatsapp post-Covid, así te reirás un buen rato. Nosotras



podemos con todo y aquí va la dedicatoria a quienes osaron dudar de ello y nos quisieron poner la zancadilla.

También quiero dar las gracias a mis nuevos compañeros, que me han apoyado estos meses en los que he estado cabalgando sobre dos caballos a la vez, habéis sido todo un apoyo, algunos ya habíais pasado por esto y otros no os lo queríais ni imaginar. Gracias sobretodo a Julio, Adrián, Josué, Irene, Ana...pero muy especialmente a Aurora, me llevo una buena amiga, un tesoro en estos tiempos.

Perdón por aquellos que haya podido olvidar, han pasado muchos años, una pandemia y el comienzo de un nuevo camino. Mi cabeza ya no es lo que era.

Por último, pero no menos importante. Aunque ya está dedicada esta tesis a ellos, y para mi eso lo engloba todo, gracias a mi familia (mami, Alberto y Cris), por soportarme, por escuchar, por preocuparse y por dejarme regañarles, aunque últimamente os revelais mucho. Sin la familia no se puede seguir adelante, siempre es más fácil cuando está. Albertillo, espero estar en tus agradecimientos, yo me leeré tu tesis, a ver si tú te lees esta. También al resto de mi familia, la valdemoreña, a mis tias y a la Yaya, por apoyarme y suplirme cuando esta tesis requería toda mi energía. También a mi familia *vallekana* (Alicia, Luis y Clara), por entender, por apoyar y animar, por esos tupperts salvadores. Y lo siento, pero tengo que decirlo, gracias a esas 3 peluditas gatunas que son el mejor ansiolítico del mundo, aquí están durmiendo a mi alrededor mientras escribo estas líneas, a lo largo de esta tesis se podrían encontrar sus huellas si no fuera digital.

Y lo siento, pero te ha llegado el turno, se que tu cara estará cambiando de color, pero concédeme dedicarte estas palabras en público. Gracias Alberto, apareciste en el momento preciso de mi vida, y te ha tocado aguantar de todo, minutos y horas esperando a que saliera, mi estrés, mi poco tiempo para dedicarte, mi cabeza ida, has buscado 1000 maneras de vernos en cualquier ratito, costándote eso kilómetros y dormir menos. Gracias, por

aguantarme, por quererme, no sé si podré compensar todo lo que haces por mí, pero espero tener el resto de mi vida para intentarlo. Esta etapa ha acabado, hemos comenzado una nueva, juntos, y ni una pandemia nos va a parar, aunque nos mantenga 3 meses separados. Te quiero.

# Índice

Listado de Abreviaturas .....	I
RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	5
1. Introducción .....	9
1.1. Biocatálisis .....	11
1.2. Lipasas .....	14
1.2.1. Fuentes de lipasas .....	16
1.2.2. Estructura .....	16
1.2.3. Reacciones catalizadas por lipasas. Mecanismo catalítico ..	18
1.2.4. Lipasas para biocatálisis .....	22
1.2.5. Principales aplicaciones industriales de las lipasas .....	25
1.2.6. Lipasas utilizadas en este trabajo .....	33
1.3. Inmovilización .....	37
1.3.1. Soportes .....	39
1.3.2. Tipos de inmovilización .....	41
2. Objetivos .....	47
3. Materiales y métodos .....	51
3.1. Microorganismos .....	53
3.2. Medios de cultivo .....	53
3.3. Condiciones de cultivo y obtención de crudos enzimáticos .....	53
3.4. Lipasas comerciales .....	54
3.5. Determinaciones analíticas .....	55
3.5.1. Medida del crecimiento .....	55
3.5.2. Valoración de la concentración de proteínas .....	55
3.5.3. Valoración de actividad enzimática .....	55
3.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	56
3.7. Soportes empleados para la inmovilización .....	58
3.8. Funcionalización superficial de los soportes .....	59
3.8.1. Funcionalización con grupos hidrofóbicos .....	59
3.8.2. Funcionalización con grupos amino .....	59
3.8.3. Funcionalización con grupos aldehído superficiales .....	61
3.9. Métodos de inmovilización .....	63
3.9.1. Inmovilización no covalente (interacción hidrofóbica) sobre SiMAG-Octyl .....	64
3.9.2. Inmovilización covalente .....	64

3.9.3. Seguimiento de la eficiencia de inmovilización. Evaluación de la actividad de los nanobiocatalizadores producidos .....	70
3.10. Caracterización .....	70
3.10.1. Espectroscopia de infrarrojos mediante transformada de Fourier (FTIR) .....	70
3.10.2. Magnetismo .....	71
3.10.3. Difracción de rayos X (XRD) .....	71
3.10.4. Microscopía electrónica .....	72
3.11. Microscopía confocal láser de barrido .....	72
3.12. Estabilidad de los nanobiocatalizadores .....	75
3.12.1. Estabilidad a pH y temperatura .....	75
3.12.2. Estabilidad de almacenamiento .....	76
3.12.3. Estabilidad operacional .....	76
3.13. Aplicaciones biotecnológicas .....	76
3.13.1. Esterificación de ácidos grasos de cadena corta: aromas .....	77
3.13.2. Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga: biodiesel .....	78
3.13.3. Síntesis de ésteres de estanoles: nutraceúticos .....	80
3.14. Métodos de análisis utilizados para el seguimiento de las reacciones. Identificación y cuantificación de sustratos y productos .....	83
3.14.1. Cromatografía en capa fina (TLC) .....	83
3.14.2. Reacciones de síntesis de ésteres de ácidos grasos de cadena corta .....	84
3.14.3. Reacciones de síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga .....	85
3.14.4. Análisis de muestras de las reacciones de síntesis de ésteres de estanoles .....	85
3.15. Análisis de citotoxicidad de los nanobiocatalizadores .....	86
4. Resultados y discusión .....	89
4.1. Lipasas .....	91
4.2. Soportes .....	93
4.2.1. Caracterización de los soportes magnéticos .....	95
4.2.2. Caracterización de los soportes no magnéticos .....	101
4.2.3. Determinación de la densidad de grupos amino superficiales en los soportes amino-funcionalizados .....	104
4.3. Inmovilización de OPEr y otras lipasas .....	105
4.3.1. Inmovilización no covalente sobre MNPs .....	106
4.3.2. Inmovilización covalente sobre MNPs .....	110

4.3.3.	Inmovilización covalente de OPEr sobre óxidos mixtos Zn/Mn .....	121
4.3.4.	Comparación de los nanobiocatalizadores obtenidos .....	122
4.3.5.	Estabilidad de los nanobiocatalizadores .....	124
4.3.6.	Microscopía confocal láser de barrido .....	138
4.3.7.	Citotoxicidad .....	142
4.4.	Síntesis enzimática de aromas y saborizantes .....	145
4.4.1.	Esterificación directa catalizada por OPEr .....	146
4.4.2.	Esterificación directa catalizada por Cal A® y Cal B® .....	150
4.4.3.	Esterificación directa de los ácidos ramificados isobutírico e isovalérico catalizada por OPEr .....	152
4.4.4.	Efecto de la concentración de los sustratos .....	154
4.4.5.	Efecto de la proporción molar de los sustratos .....	156
4.4.6.	Reciclabilidad de AMNP-CH-OPEr y AMNP-GA-OPEr en la síntesis de ésteres butílicos .....	159
4.5.	Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga (biodiesel) .....	161
4.5.1.	Síntesis de biodiesel catalizada por OPEr .....	164
4.5.2.	Síntesis de biodiesel catalizada por las enzimas comerciales .....	167
4.5.3.	Comparación de la eficiencia en síntesis de biodiesel de todos los catalizadores .....	171
4.5.4.	Reciclabilidad de los nanobiocatalizadores en la síntesis de biodiesel .....	174
4.5.5.	Escalabilidad de la reacción .....	179
4.6.	Síntesis de ésteres de $\beta$ -sitoestanol .....	180
4.6.1.	Esterificación directa de $\beta$ -sitoestanol catalizada por lipasas solubles .....	182
4.6.2.	Transesterificación $\beta$ -sitoestanol catalizada por lipasas solubles .....	188
4.6.3.	Transesterificación de $\beta$ -sitoestanol catalizada por los nanobiocatalizadores de OPEr .....	190
4.6.4.	Reacciones en cascada para la síntesis de ésteres de estanol a partir de metanol y aceite .....	196
5.	Conclusiones .....	201
6.	Anexos .....	205
	Anexo I .....	207
	Anexo II .....	208
	Anexo III .....	214

<b>Anexo IV .....</b>	<b>215</b>
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>217</b>

## Listado de Abreviaturas

$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrometros
$\mu\text{M}$	Micromolar
A549	Células humanas tumorales del epitelio alveolar basal
Ae	Actividad específica
AG1	Soporte no magnético de $\text{Zn}_{0,25}/\text{Mn}_{2,75}$ aminofuncionalizado
AG4	Soporte no magnético de $\text{Zn}_{0,85}/\text{Mn}_{2,15}$ aminofuncionalizado
AG1-CH-OPeR	Nanobiocatalizador de OPeR inmovilizada a través de CH-sobre AG1
AG4-CH-OPeR	Nanobiocatalizador de OPeR inmovilizada a través de CH-sobre AG4
AG1-GA	Soporte no magnético de $\text{Zn}_{0,25}/\text{Mn}_{2,75}$ funcionalizado con grupos aldehído
AG4-GA	Soporte no magnético de $\text{Zn}_{0,85}/\text{Mn}_{2,15}$ funcionalizado con grupos aldehído
AG1-GA-OPeR	Nanobiocatalizador de OPeR inmovilizada sobre AG1-GA
AG4-GA-OPeR	Nanobiocatalizador de OPeR inmovilizada sobre AG4-GA
AGs	Ácidos grasos
Ai	Actividad lipasa inicial
AMNPs	Nanopartículas magnéticas aminofuncionalizadas
AMNPs-CH-Cal A	Nanobiocatalizador de Cal A® inmovilizada a través de CH-sobre AMNPs
AMNPs-CH-Cal B	Nanobiocatalizador de Cal B® inmovilizada a través de CH-sobre AMNPs
AMNPs-CH-Eversa	Nanobiocatalizador de Eversa® inmovilizada a través de CH-sobre AMNPs
AMNPs-CH-OPeR	Nanobiocatalizador de OPeR inmovilizada a través de CH-sobre AMNPs
AMNPs-GA	AMNPs funcionalizadas con grupos aldehído
AMNPs-GA-Cal A	Nanobiocatalizador de Cal A® inmovilizada sobre AMNPs-GA
AMNPs-GA-Cal B	Nanobiocatalizador de Cal B® inmovilizada sobre AMNPs-GA
AMNPs-GA-Eversa	Nanobiocatalizador de Eversa® inmovilizada sobre AMNPs-GA
AMNPs-GA-OPeR	Nanobiocatalizador de OPeR inmovilizada sobre AMNPs-GA
APTS	(3-aminopropil) trietoxisilano
Ar	Actividad lipasa residual

BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
C4	Ácido butírico
C5	Ácido pentanoico/Ácido valérico
C6	Ácido hexanoico
C7	Ácido heptanoico
Cal A	Lipasa A de <i>Candida antarctica</i>
Cal B	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
CH-	Carbohidratos
CLEAs	Agregados enzimáticos entrecruzados/ <i>Cross-linked enzyme aggregates</i>
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
Da	Dalton
DGs	Diglicéridos
DMEM	Medio <i>Dulbecco modified Eagles minimal essential</i>
DO	Densidad óptica
EMs	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FE-SEM	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
FTIR	Espectroscopia de infrarrojos mediante transformada de Fourier
G1	Soporte no magnético de Zn <sub>0,25</sub> /Mn <sub>2,75</sub>
G4	Soporte no magnético de Zn <sub>0,85</sub> /Mn <sub>2,15</sub>
GA	Glutaraldehído
GC	Cromatografía de gases
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas
HeLa	Células humanas de carcinoma de cuello uterino
IC4	Ácido isobutírico
IC5	Ácido isopentanoico/Ácido isovalérico
IC <sub>50</sub>	Dosis que inhibe el crecimiento del 50% de las células
mCLEAs	Agregados enzimáticos entrecruzados magnéticos/ <i>Magnetic cross-linked enzymes aggregates</i>
MGs	Monoglicéridos



mM	Milimolar
MNPs	Nanopartículas magnéticas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
mU	Mili unidades de actividad enzimática
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas
OPE	Lipasa versátil de <i>Ophiostoma piceae</i>
OPeR	Lipasa versátil recombinante de <i>Ophiostoma piceae</i>
PBS	Tampón fosfato salino
pI	Punto isoelectrico
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo
p/v	Relación peso/volumen
RML	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>
rpm	Revoluciones por minuto
ROL	Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Dodecilsulfato Poliacrilamida-Gel-Electroforesis
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SiMAG-Octyl®	Soporte magnético comercial funcionalizado con grupos octilo
SiMAG-Octyl-OPeR	Nanobiocatalizador de OPeR inmovilizada por hidrofobidad sobre SiMAG-Octyl®
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGs	Triglicéridos
TLL	Lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
TMAB	Trimetil amino borano
Tris-HCl	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol hidrocloreuro
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen
VFAs	Ácidos grasos volátiles/Ácidos grasos de cadena corta

XRD	Difracción de rayos X
YEPS	Medio extracto de levadura peptona sorbitol
YPD	Medio extracto de levadura peptona dextrosa



## ***Resumen/Summary***

## RESUMEN

### Introducción

En trabajos anteriores, se aisló y caracterizó una lipasa versátil producida por el ascomiceto *Ophiostoma piceae*, a la que se denominó OPE. La enzima recombinante (OPEr), obtenida en *Pichia pastoris*, se produce en mayor cantidad y es más activa que la nativa, confirmando su potencial para bioprocesos de hidrólisis y síntesis. Para mejorar su estabilidad y facilitar la separación y reutilización, se ha evaluado su inmovilización. Esto conlleva la fijación del catalizador sobre un soporte sólido insoluble mediante interacciones no covalentes o covalentes. Estas últimas suelen producir biocatalizadores más estables y con mejor reciclabilidad.

### Objetivos

El objetivo de esta Tesis se centró en la puesta a punto y evaluación de diferentes métodos de inmovilización para OPEr, aplicando los biocatalizadores obtenidos a la síntesis de ésteres. Los objetivos concretos fueron:

- i. Síntesis y caracterización fisicoquímica de soportes funcionalizados.
- ii. Preparación de una batería de nanobiocatalizadores con OPEr inmovilizada.
- iii. Evaluación del potencial de los nanobiocatalizadores para sintetizar ésteres de ácidos grasos volátiles, biodiesel, y ésteres de sitoestanol.

### Resultados

#### Inmovilización de OPEr

Se evaluaron dos tipos de soportes: nanopartículas de magnetita y óxidos mixtos de Zn/Mn no magnéticos. Estos últimos son materiales nuevos obtenidos del reciclado de pilas

por el grupo del Dr. Félix López (CNIM-CSIC). Los soportes se recubrieron de una fina capa de Si, se incorporaron en su superficie grupos amino o aldehído, y se caracterizaron físico-químicamente.

OPeR se unió covalentemente a los soportes por diferentes regiones: a) por su amino terminal, b) por sus cadenas glucídicas oxidadas, o c) formando agregados entrecruzados químicamente sobre soporte magnético (mCLEAs). También se utilizó un soporte magnético comercial con grupos octilo superficiales (SiMAG-Octyl®) para inmovilizar OPeR por hidrofobicidad. Así, se obtuvieron ocho nanobiocatalizadores con distinta eficiencia, estabilidad y reciclabilidad. Todos ellos hidrolizaron eficazmente butirato de *p*-nitrofenilo, aunque con distinta eficacia, y su estabilidad a pH y temperatura fueron mayores que las de la enzima libre. Su actividad a 4 °C se mantuvo (80-100%) durante más de 6 meses.

Para comparar los resultados obtenidos con OPeR, también se inmovilizaron covalentemente las lipasas comerciales CalA®, CalB® y Eversa® sobre los soportes AMNPs-GA- y AMNPs-.

### **Síntesis de ésteres de ácidos grasos de cadena corta (VFAs)**

Estos ésteres contribuyen al aroma y sabor natural de las frutas y verduras, y se utilizan como aditivos en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria. Sus características sensoriales dependen de la longitud de la cadena del ácido y el alcohol. Los ocho catalizadores con OPeR inmovilizada catalizaron la esterificación directa de los ácidos butírico, valérico, hexanoico, heptanoico, isobutírico e isovalérico con 1-butanol (25 °C, ácido:alcohol 1:2). Los rendimientos con AMNP-GA-OPeR (~100%, 6 h) superaron o igualaron los de OPeR libre y los restantes catalizadores OPeR, manteniendo 80-96% de actividad durante 7 ciclos. Esto revela sus excelentes propiedades y potencial para la síntesis limpia de productos de interés. Entre las enzimas evaluadas en esta aplicación, Cal B® fue la más eficiente en las condiciones ensayadas.

## **Síntesis de biodiesel**

El biodiesel está compuesto por ésteres de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes de cadena corta, generalmente metanol o etanol. Su síntesis enzimática sigue planteando retos, como la falta de estabilidad operativa de las enzimas en presencia de alcoholes y la acumulación del glicerol. Hemos analizado la eficiencia de OPEr, Eversa<sup>®</sup>, CalA<sup>®</sup> y CalB<sup>®</sup>, para catalizar la síntesis de biodiesel, sin disolvente y a 25 °C, a partir de aceite de cocina desechado y metanol. Varias de las preparaciones con OPEr inmovilizada produjeron altos rendimientos de síntesis (>90% transesterificación) y mantuvieron ~100% de actividad tras 9 ciclos de síntesis, aunque la velocidad de reacción fue algo menor que la de Eversa<sup>®</sup>. El proceso catalizado por AMNP-CH-OPEr se escaló 50 veces y la eficacia fue superior. Los nanobiocatalizadores con CalB<sup>®</sup> no transformaron los glicéridos en las condiciones ensayadas.

## **Síntesis de ésteres de fitoestanoles**

Los fitoesteres y fitoestanoles reducen la absorción del colesterol y se utilizan como nutraceuticos, aunque sus ésteres tienen mayor efecto. Los esterol son sustratos muy voluminosos, con grupos OH poco accesibles, y pocos biocatalizadores han demostrado ser apropiados para mediar su esterificación. Sin embargo, OPEr libre demostró su eficiencia transesterificando  $\beta$ -sitoestanol y oleato de metilo a 25 °C, sin cosolvente. Con la enzima inmovilizada, se ha observado una baja eficiencia en el primer ciclo de reacción, aumentando en los dos siguientes, con rendimientos de esterificación superiores al 80% durante varios ciclos de entre 2-15 h. Vista su eficiencia, se ensayó la síntesis de ésteres de  $\beta$ -sitoestanol a partir de aceite de cocina usado, metanol y el estanol, encadenando dos reacciones, y con un solo nanobiocatalizador (AMNP-CH-OPEr). En la primera etapa (24 h) se sintetizaron ésteres metílicos de ácidos grasos por transesterificación. En la segunda etapa (2 h) se añadió  $\beta$ -sitoestanol a la mezcla anterior para producir los ésteres de estanol. El rendimiento fue un 45% superior al

obtenido con oleato de metilo comercial y la actividad se mantuvo durante 5 ciclos.

## Conclusiones

La lipasa OPEr fue inmovilizada sobre MNPs por interacción hidrofóbica, por acoplamiento covalente (AMNPs-CH y AMNPs-GA), o como mCLEAs. También se unió covalentemente sobre los nuevos soportes no magnéticos G1 y G4. Se ha validado un método inusual para la inmovilización de lipasas a través de sus cadenas glucídicas oxidadas, que preserva y estabiliza la estructura y la actividad de las proteínas.

Todos los preparados enzimáticos insolubles catalizaron la síntesis de ésteres butílicos de VFAs, pero AMNP-GA-OPEr fue más eficiente y estable frente a sustratos ácidos, manteniendo excelentes rendimientos después de 7 ciclos. Varios nanobiocatalizadores demostraron ser robustos, eficientes y reciclables (~100% actividad tras 9 ciclos) en síntesis de biodiesel, en condiciones extremadamente suaves, utilizando materias primas sostenibles y baratas, y mediante un proceso fácilmente escalable. Todos los nanobiocatalizadores de OPEr catalizaron la síntesis de ésteres de estanoles (85%, 2-15 h, sin disolventes) y pudieron ser reutilizados. A la vista de los resultados, OPEr inmovilizada se muestra como un buen catalizador para su uso en distintos bioprocesos.



## SUMMARY

### Introduction

In previous work, a versatile lipase produced by the ascomycete *Ophiostoma piceae*, called OPE, was isolated and characterized. The recombinant enzyme (OPEr) obtained in *Pichia pastoris* is produced in larger amount and is more active than the native protein, confirming its potential for hydrolysis and synthesis bioprocesses. The role of immobilization to improve its efficiency and stability, and to facilitate its separation and reuse has been evaluated in the current Thesis. Immobilization involves fixing the catalyst on an insoluble solid support through non-covalent or covalent interactions. The latter method usually produces more stable biocatalysts with better recyclability.

### Objectives

The objective of this Thesis focused on setting up and testing different methods of immobilization for OPEr, applying the biocatalysts obtained to the synthesis of esters. The specific objectives are:

- i. Synthesis and physicochemical characterization of functionalized supports.
- ii. Preparation of a set of nanobiocatalysts with immobilized OPEr.
- iii. Evaluation of the potential of the nanobiocatalysts to synthesize esters of volatile fatty acids, biodiesel, and sitoestanol esters.

## Results

### OPEr immobilization

Two types of carriers were evaluated: magnetite nanoparticles and non-magnetic Zn/Mn mixed oxides. The latter are new materials obtained from battery recycling in the group of Dr. Félix López (CNIM-CSIC). The carriers were physically-chemically characterized after coating them with a thin layer of Si and incorporating amino or aldehyde groups on their surface.

OPEr was covalently attached to the insoluble scaffolds: a) by its terminal, b) by its oxidized glycidic chains, or c) forming chemically crosslinked aggregates on the magnetic support (mCLEAs). A commercial magnetic support with surface octyl groups (SiMAG-Octyl®) was also used to immobilize OPEr for hydrophobicity. Thus, we obtained eight nanobiocatalysts with different efficiency, stability, and recyclability. Although with different efficiency, all of them hydrolysed *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB), and their stability to pH and temperature were higher to that of the free enzyme. Their activity at 4 °C was maintained (80-100%) for more than 6 months.

To compare the results obtained for OPEr, the commercial lipases CalA®, CalB® and Eversa® were immobilized on AMNPs-GA- and AMNPs-.

### Synthesis of esters of volatile fatty acids (VFAs)

These esters contribute to the natural fragrance and taste of fruits and vegetables, and are commonly used as additives in the pharmaceutical, cosmetics and food industries. Their sensory properties depend on the length of the chains of their acid and alcohol precursors. The eighth preparations with immobilized OPEr catalyzed direct esterification of butyric, valeric, hexanoic, heptanoic, isobutyric, and isovaleric acid with 1-butanol (25 °C, acid:alcohol 1:2). With AMNP-GA-OPEr, the yields (~100%, 6 h) exceeded or equaled those obtained with free OPEr or any other of the OPEr preparations, maintaining 80-96% activity after 7 reaction cycles. Despite Cal B® was the most efficient catalyst

among those studied for this application, the results reveal that the excellent properties of the immobilized forms of OPEr and its potential for green synthesis of esters.

### **Synthesis of biodiesel**

Biodiesel is composed of long-chain fatty acid esters with short-chain alcohols, usually methanol or ethanol. Its enzymatic synthesis continues to pose challenges, such as the lack of operational stability of enzymes in the presence of alcohols and the accumulation of glycerol. We have analyzed the efficiency of OPEr, Eversa®, CalA® and CalB®, to catalyze the synthesis of biodiesel, solvent-free and at 25 °C, from cooking oil wastes and methanol. Several the preparations with immobilized OPEr produced high synthesis yields (>90% transesterification) and maintained 100% activity after 9 synthesis cycles, although the reaction rate was somewhat lower than that of Eversa®. The process catalyzed by AMNP-CH-OPEr was scaled 50 times and the efficiency was superior. Cal B® nanobiocatalysts did not transform glycerides in the tested conditions.

### **Synthesis of stanol esters**

Phytosterols and phytostanols reduce cholesterol absorption and are used as nutraceuticals, although their esters have greater effect. Sterols are very bulky substrates, with low accessibility -OH groups, and few biocatalysts have shown to be suitable for mediating their esterification. However, the soluble OPEr demonstrated its efficiency by transesterifying  $\beta$ -sitoestanol and methyl oleate at 25 °C, without cosolvent. The efficiency in the first reaction cycle with immobilized enzyme was low, but it increased in the next two cycles reaching esterification yields over 80% over several cycles in 2-15 h. Given its efficiency, the synthesis of  $\beta$ -sitoestanol esters from used cooking oil, methanol and stanol was tested, by combining two consecutive reactions, catalyzed by a single nanobiocatalyst (AMNP-CH-OPEr). In the first stage (24 h) methyl esters of fatty acids were synthesized by transesterification. In the second stage (2 h)  $\beta$ -sitostanol was added to the previous mixture to produce the

stanol esters. The yield was 45% higher than that obtained with commercial methyl oleate and activity remained unchanged for 5 cycles.

## Conclusions

The versatile lipase OPEr was immobilized over MNPs by hydrophobic interaction, by covalent coupling (AMNPs-CH and AMNPs-GA), or as mCLEAs. It was also covalently attached on the novel non-magnetic supports G1 and G4. An unusual method for immobilizing lipases through their oxidized glycidic chains has been validated, preserving and stabilizing the structure and activity of proteins.

All preparations with the insoluble enzyme catalyzed the synthesis of butyl esters of VFAs, but AMNP-GA-OPEr was more efficient and stable against acid substrates, maintaining excellent yields after 7 cycles. Several nanobiocatalysts proved robust and efficient for up to 9 biodiesel synthesis cycles (~100% activity), under extremely mild conditions, using sustainable and inexpensive raw materials, and through an easily scalable process. All OPEr nanobiocatalysts catalyzed the synthesis of stanol esters (85%, 2-15 h, solvent-free) and could be reused. In view of the results, immobilized OPEr is shown as a good catalyst for use in different bioprocesses.

# ***1. Introducción***



### 1.1.Biocatálisis

Las enzimas son los catalizadores que aceleran las reacciones químicas en los seres vivos. Al igual que los catalizadores químicos, actúan disminuyendo la energía de activación de la reacción, de modo que los productos se forman más rápidamente (hasta millones de veces, comparándolo con la misma reacción sin catalizador) y se alcanza antes el equilibrio (Tanaka, 2019). Consciente o no de cuáles son las moléculas que llevan a cabo estas tareas, el ser humano se ha aprovechado de su existencia desde hace milenios, y encontramos ejemplos de ello en la elaboración de bebidas fermentadas, alimentos como el pan y tejidos (Singh *et al.*, 2016). A lo largo del siglo XIX, varios investigadores fueron aportando datos acerca de su existencia y función. Berzelius describió en 1836 el fenómeno de catálisis (del griego, desatar) como aquél en el que los entonces denominados “compuestos invitados” (catalizadores) aceleraban una determinada reacción química, sin sufrir ellos mismos ninguna modificación. Kühne acuñó el término *enzima* (del griego, en levadura), Fisher estableció el concepto de especificidad de sustrato, y Buchner postuló que las enzimas eran las responsables de la fermentación alcohólica en un sistema libre de células. En 1926 Sumner aisló y cristalizó por primera vez una enzima pura, la ureasa, y demostró la naturaleza proteica de las enzimas, por lo que recibió el Premio Nobel 20 años más tarde. Otros dos químicos estadounidenses, Northrop y Stanley, compartieron con él dicho galardón por su trabajo relacionado con el aislamiento de la pepsina. Estos investigadores fueron los pioneros de lo que hoy conocemos como *Biocatálisis*, una rama de la biotecnología blanca definida como el uso de células o sus enzimas aisladas para catalizar reacciones o transformaciones que conducen a la obtención de compuestos de interés, que satisfacen numerosas necesidades humanas (Arroyo *et al.*, 2014). La aplicación de enzimas en procesos industriales se ha multiplicado en los últimos 40 años, abarcando en la actualidad sectores tales como la alimentación humana y animal, agricultura, industrias textil y papelera, fabricación de

detergentes, compuestos químicos, biocombustibles, síntesis de polímeros y compuestos orgánicos (aromas), y especialmente en la producción de compuestos farmacéuticos (McAuliffe, 2012; Patel *et al.*, 2017). Las enzimas ofrecen una alta especificidad de sustrato, pureza del producto y, en general, un reducido impacto ambiental. Su utilización, en contraste con la catálisis química, disminuye el gasto energético puesto que se trabaja a menor temperatura, a valores menos extremos de pH, y se reduce el empleo de disolventes orgánicos o la utilización de sustancias tóxicas y/o peligrosas (Paul *et al.*, 2019; Sanchez and Demain, 2017; Sheldon and Woodley, 2018).

Los avances en este ámbito se han sucedido y expandido a lo largo de la historia a modo de ondas, iniciadas a partir del descubrimiento de nuevos hitos o de la aplicación de nuevas tecnologías. En la primera de ellas, que comenzó hace más de un siglo, los principales problemas a afrontar eran las reacciones cruzadas con otras rutas metabólicas y la difusión de los sustratos, hoy en día solventados gracias a la ingeniería metabólica (Bornscheuer *et al.*, 2012; Sheldon and Woodley, 2018).

A finales del siglo XX, la biocatálisis experimentó una segunda fase de desarrollo al comenzar a emplear enzimas para catalizar reacciones con sustratos muy diferentes a los que se encuentran en su entorno natural. Los avances fueron muy notables, en gran parte gracias a la aparición de las técnicas de ingeniería de proteínas. A finales de los 90, se inició un tercer periodo de crecimiento e innovación, gracias al desarrollo de las técnicas de evolución dirigida y biología molecular avanzada (Basso and Serban, 2019; Bornscheuer *et al.*, 2012). Desde entonces, la biocatálisis ha evolucionado rápidamente debido a los avances en biología molecular, secuenciación y, especialmente, en bioinformática. Actualmente, esto permite diseñar una enzima para que se ajuste a un proceso y no tratar de rediseñar un proceso para ajustarlo a la enzima disponible. Por esta razón, algunos autores sugieren que nos encontramos a



las puertas de la cuarta expansión de la biocatálisis (Bornscheuer, 2018).

Hoy en día se conocen más de 4.000 enzimas, aunque sólo el 5% están comercializadas y unas 20 se producen a una escala verdaderamente industrial (Liu and Kokare, 2017; Sanchez and Demain, 2017). Los rápidos avances del mercado mundial de biocatalizadores están impulsados por su capacidad para catalizar reacciones con mayor eficiencia y estabilidad, su quimio-, regio- y enantioselectividad, así como sus características respetuosas con el medioambiente en comparación con los procesos químicos (Lai *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2016). Ya en 2016 se estimaba que el mercado de las enzimas representaba 5.010 millones de dólares y que crecería en 2021 hasta los 6.320 millones de dólares. Además, en 2005, se preveía que las ventas mundiales de bioproductos crecieran cerca del 15% en 2025 (Chapman *et al.*, 2018; Paul *et al.*, 2019).

De entre las enzimas comercializadas, el 85% provienen de microorganismos. Entre sus ventajas, frente a las de plantas y animales, podemos destacar que son más estables, presentan una gran diversidad bioquímica, son más fáciles de modificar genéticamente, y se producen en condiciones reproducibles (Patel *et al.*, 2017). Aproximadamente el 90% de las enzimas industriales son versiones recombinantes, ya que las enzimas naturales no suelen ser adecuadas para su uso en bioprocesos. En este sentido, comentar que, generalmente, las cepas de producción suelen estar modificadas mediante manipulación genética, para mejorar sus propiedades catalíticas y conseguir altos niveles de producción (Liu and Kokare, 2017; Sanchez and Demain, 2017). Gracias a la metagenómica, las herramientas genéticas y otras técnicas, como la modificación química, se pueden obtener enzimas más estables o con mejor actividad. Pero, aun así, el uso de enzimas solubles no evita los problemas de estabilidad operacional, térmica y mecánica. Como veremos más adelante, la obtención de formas insolubles de la enzima mediante inmovilización puede ofrecer la solución a algunos de estos problemas (Facin *et al.*, 2019).

En la industria de la biocatálisis están representadas todo tipo de enzimas: oxidorreductasas, liasas, transferasas, isomerasas, ligasas y, por supuesto, hidrolasas. Las hidrolasas son los biocatalizadores más usados en síntesis orgánica e incluyen enzimas de especial interés como amidasas, proteasas, esterasas y lipasas (Paul *et al.*, 2019). En concreto, las lipasas han sido ampliamente usadas en numerosas reacciones de interés industrial en los sectores alimentario, farmacéutico, cosmético, del papel y de biocombustibles, encontrando su aplicación comercial más importante en la industria de los detergentes (De Godoy Daiha *et al.*, 2015; Facin *et al.*, 2019). Su gran éxito se debe a que tienen una excelente actividad, alta especificidad y estabilidad, y a que en muchas ocasiones actúan de forma enantioselectiva, quimio- y/o regio-específica (Borrelli and Trono, 2015; Filho *et al.*, 2019; Stergiou *et al.*, 2013). El potencial de las lipasas es conocido desde 1930 y, a día de hoy, suponen el 10% de la industria global de enzimas (junto con las esterasas), sólo detrás de proteasas y carbohidrolasas (Borrelli and Trono, 2015; Lai *et al.*, 2019).

## 1.2.Lipasas

Las carboxil éster hidrolasas (EC 3.1.1) son un grupo heterogéneo de enzimas que catalizan la hidrólisis o síntesis de enlaces éster. En este grupo están incluidas las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), las lipasas o triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3) y las esterol esterasas (EC 3.1.1.13), entre otras. Todas estas enzimas se han clasificado en base a su secuencia primaria, características estructurales, si presentan o no activación interfacial, su cinética y su susceptibilidad a inhibidores específicos (Lai *et al.*, 2019).

La actividad de las lipasas sobre sustratos solubles en agua es tan solo marginal, y se relaciona más con la hidrólisis de sustratos lipídicos insolubles con tendencia a agregar en medio acuoso, como los triglicéridos. Considerando el carácter hidrófilo de las proteínas y el lipófilo de los sustratos sobre los que actúan,

es fácil comprender que estas enzimas ejercen su acción en la interfase lípido/agua. Una característica muy particular de muchas lipasas es que incrementan enormemente su actividad cuando la concentración del sustrato supera su límite de solubilidad, formando micelas o emulsiones, cosa que no se ha descrito en las esterol esterasas. Este fenómeno, conocido como *activación interfacial*, describe la activación de la enzima en dichas interfases (Lotti and Alberghina, 2007; Reis *et al.*, 2009). Por otra parte, las esterol esterasas actúan sobre ésteres de ácidos grasos del colesterol y de otros esteroides en medio acuoso, aunque muchas de ellas también son activas frente a los sustratos estándar de las lipasas.

La diferenciación entre lipasas y esterol esterasas sigue siendo objeto de debate hasta la fecha (Ali *et al.*, 2012; Fojan *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2019), ya que algunas enzimas, definidas inicialmente como lipasas, tienen también alta actividad sobre ésteres de esteroides. Esto se describió en distintas isoenzimas con alta identidad de secuencia de la levadura *Candida rugosa* (CRL1, CRL2 y CRL3) (Mancheño *et al.*, 2003). No obstante, se sabe que la eficacia de cada una de ellas sobre triglicéridos y ésteres de esteroides difiere. Las peculiares características de estas enzimas llevaron al establecimiento de la familia *Candida rugosa-like*, en la que se agrupan también otras isoenzimas de esta levadura y lipasas de otros hongos. Recientemente se ha propuesto que las lipasas con amplia especificidad de sustrato capaces de actuar sobre triglicéridos y ésteres de esteroides, pasen a formar parte de otra familia, la de las “lipasas versátiles” (Barriuso *et al.* 2016).

La enzima objeto de estudio en esta Tesis, producida por el hongo ascomiceto dimórfico *Ophiostoma piceae*, caracterizada inicialmente como una esterol esterasa, y con actividad sobre ésteres de esteroides y triglicéridos (Calero-Rueda *et al.*, 2002b), pertenece también a la familia *C. rugosa-like* (Barriuso *et al.*, 2016) y, debido a su amplia especificidad de sustrato, debería también incluirse en la familia de las “lipasas versátiles”.

### 1.2.1. Fuentes de lipasas

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por plantas, animales y microorganismos. En mamíferos, estas enzimas están involucradas en la digestión y absorción de las grasas y en el metabolismo de las lipoproteínas (Mukherjee, 2003). En plantas, están presentes en semillas oleaginosas y cereales, participando principalmente en el proceso de germinación (Lai *et al.*, 2019). Como ya se ha comentado, las lipasas microbianas (de bacterias, levaduras y hongos filamentosos) tienen un gran interés industrial debido a que es fácil producirlas y modificarlas, y por su versatilidad y estabilidad (Filho *et al.*, 2019; Hasan *et al.*, 2006). *Candida*, *Yarrowia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* y *Thermomyces* se encuentran entre los géneros de levaduras y hongos más empleados para la producción de lipasas. En cuanto a las bacterias, las más conocidas son las producidas por *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces*, seguidas por las de *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Arthrobacter* (Borrelli and Trono, 2015; Vaquero *et al.*, 2016). El papel natural de las lipasas microbianas está relacionado con el uso de los lípidos como fuente de carbono a través del metabolismo lipídico, por lo que se han aislado de una gran variedad de hábitats, como suelos contaminados con aceites, residuos de aceites o en la superficie del queso. También existen algunos microorganismos que secretan lipasas al medio como factor de virulencia en hongos patógenos o saprófitos (Lai *et al.*, 2019; Vaquero *et al.*, 2016).

Nos centraremos desde este momento en las lipasas microbianas, concretamente las de hongos y levaduras, que son las que nos ocupan en este trabajo y que, además, presentan la ventaja de que son extracelulares.

### 1.2.2. Estructura

Desde el punto de vista estructural, las lipasas son serín hidrolasas con el típico plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa (Figura 1.1), caracterizado por poseer una lámina  $\beta$  central formada por ocho

hebras (una de ellas, la  $\beta 2$ , antiparalela a las demás), rodeada por dos capas de  $\alpha$ -hélices anfifílicas (Holmquist, 2000). El centro activo de las lipasas se localiza en la parte superior de la lámina  $\beta$ , en un bolsillo con residuos muy hidrofóbicos, para una mejor unión del sustrato. La triada catalítica está formada, generalmente, por Ser-Asp-His, aunque en algunas enzimas el residuo ácido es de glutámico (Ser-Glu-His), siendo la Ser el aminoácido implicado en el ataque nucleofílico del sustrato (Bornscheuer, 2002; Vaquero Morales, 2015).

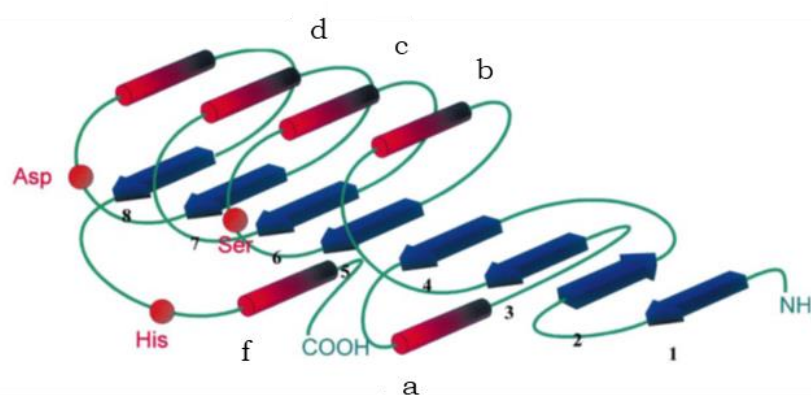


Figura 1.1. Estructura canónica del plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa de una lipasa. Flechas azules: láminas  $\beta$  1-8; cilindros rojos:  $\alpha$ -hélices a-f. Los aminoácidos de la triada catalítica se muestran como círculos rojos. Modificado de Bornscheuer (2002).

Según la geometría del sitio de unión al sustrato en el centro activo, se pueden definir tres subgrupos de lipasas (Schmidt-Dannert, 1999): i) de tipo hendidura, como en la lipasa de *Rhizomucor miehei* o *Thermomyces lanuginosus*; ii) de tipo embudo, por ejemplo, la lipasa B de *Candida antarctica*; y iii) de tipo túnel, como en la familia de lipasas *C. rugosa-like* y la lipasa A de *C. antarctica* (CAL A®) (Barriuso *et al.*, 2016; Ericsson *et al.*, 2008; Vaquero Morales, 2015). Otro componente estructural típico relacionado con la catálisis es el agujero oxaniónico, que sirve para estabilizar el estado de transición tetraédrico formado durante la catálisis (Vaquero *et al.*, 2016). La secuencia aminoacídica de esta región no está tan conservada como la de

la tríada catalítica y los aminoácidos que lo forman también puede utilizarse como criterio para una clasificación distinta de las lipasas.

Si hay una estructura característica de las lipasas es la de la zona de la tapa, un dominio móvil y anfipático que cubre el centro activo en ausencia de sustrato y es responsable, en gran parte, de la actividad y la selectividad de la enzima (Borrelli and Trono, 2015; Khan *et al.*, 2017). Esta región puede consistir en una hélice simple, dos hélices, o una región helicoidal y, según su posición, mantiene a la enzima en su conformación cerrada o abierta. En medio acuoso y en ausencia de sustrato, el equilibrio entre ambas formas está desplazado hacia la conformación cerrada, con la cara hidrofílica de la tapa expuesta al medio, mientras su cara hidrofóbica se orienta hacia el bolsillo catalítico. Sin embargo, en presencia de sustrato, en un medio hidrofóbico (orgánico) o en interfases lípido-agua, la tapa gira alrededor de dos regiones bisagra y pasa a su conformación abierta, dejando expuesta la cara hidrofóbica, que crea un gran parche hidrofóbico en la superficie de la enzima, facilitando el acceso de los sustratos (Khan *et al.*, 2017). En algunas lipasas este fenómeno de activación interfacial es muy reducido, como por ejemplo en la lipasa B de *C. antarctica* (Cal B®) (Khan *et al.*, 2017), y en otros casos no se ha detectado, aunque esto puede deberse a factores experimentales (Domínguez de María *et al.*, 2006b; Vaquero Morales, 2015; Verger, 1997). Por último, comentar que debido a la existencia de amplias regiones hidrofóbicas en su superficie, las lipasas suelen tener tendencia a agregar (Vaquero *et al.*, 2016).

### **1.2.3.Reacciones catalizadas por lipasas. Mecanismo catalítico**

Las lipasas son enzimas con amplia especificidad de sustrato, que catalizan naturalmente la hidrólisis de compuestos lipídicos, y atacan preferentemente el enlace éster de los tri-, di- y monoglicéridos, liberando ácidos grasos y glicerol. Como se ha comentado anteriormente, las lipasas versátiles (Barriuso *et al.*,



2016), hidrolizan también ésteres de esteroides. En todos los casos, la reacción se lleva a cabo en la interfase de un sistema de reacción bifásico (lípidos-agua).

Sin embargo, el gran interés que han despertado estas enzimas en los últimos años se debe a su capacidad de catalizar reacciones de síntesis (esterificación y transesterificación) en medios con baja actividad de agua (Casas-Godoy *et al.*, 2012). El término transesterificación se refiere al intercambio de grupos entre un éster y un alcohol (alcoholisis), entre un éster y un ácido (acidólisis), entre un éster y una amina (aminólisis), o entre dos ésteres (interesterificación) (Borrelli and Trono, 2015) (Figura 1.2).

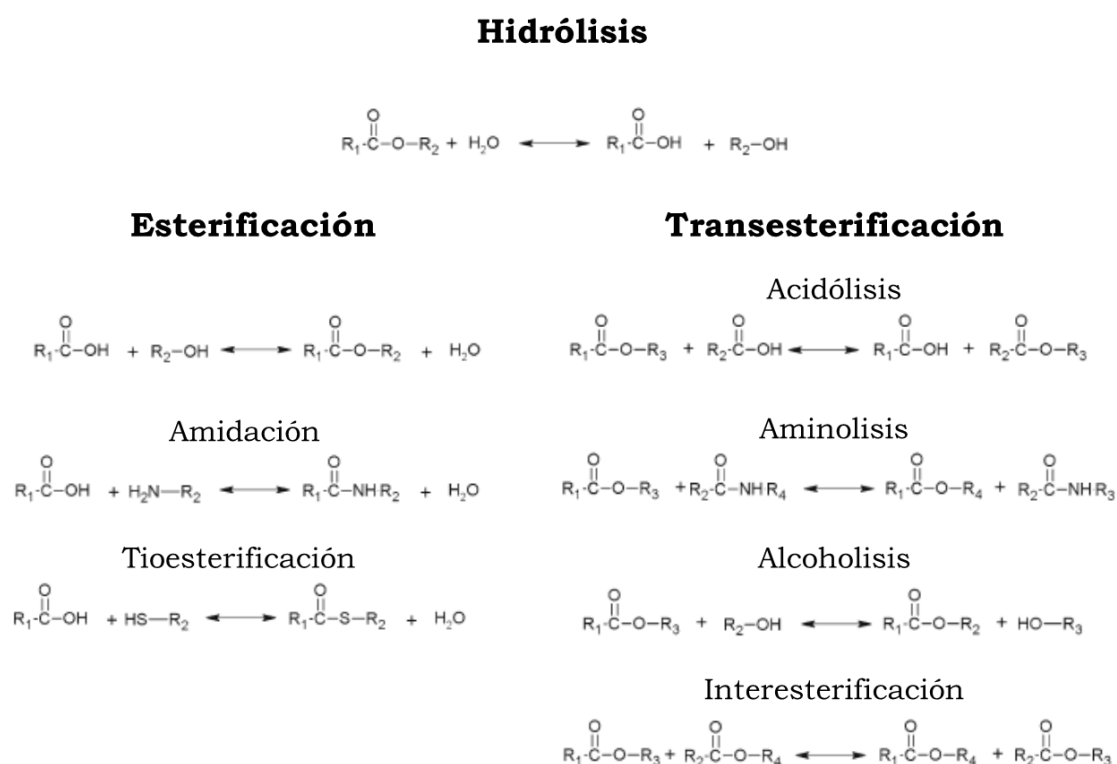


Figura 1.2. Reacciones catalizadas por lipasas. Adaptado de Casas-Godoy *et al.* (2012).

La estereoespecificidad y/o esteropreferencia de las lipasas microbianas frente a triglicéridos es variable. Pleiss *et al.* (2000) describieron la importancia de factores tales como la flexibilidad

o rigidez del sustrato y, muy especialmente, la forma y anchura del túnel, en concreto del motivo *His gap* en el que se localiza la His catalítica. No obstante, la mayoría de las lipasas son específicas de *sn*-1,3, y catalizan la hidrólisis/transesterificación de los ácidos grasos ubicados específicamente en dichas posiciones (Casas-Godoy *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2019; Pleiss *et al.*, 2000). En este caso, los ácidos grasos *sn*-2 no se unen al sitio activo de la lipasa debido a impedimentos estéricos. Entre estas enzimas están la lipasa pancreática humana, la de *Aspergillus niger* o la lipasa RML de *Rhizomucor miehei* (Filho *et al.*, 2019). Otro grupo de lipasas, como las de *C. rugosa*, la lipasa A de *C. antarctica* (Cal A®), la de *Penicillium simplicissimum* y la lipasa B de *Geotrichum candidum*, no manifiestan esta especificidad y actúan sobre los ácidos grasos de manera aleatoria, independientemente de su posición (Jaeger and Reetz, 1998). Cal B® tampoco presenta esta regioespecificidad, sin embargo, en la alcoholisis, con altas concentraciones de etanol/metanol, muestra preferencia por posiciones *sn*-1,3. Un ejemplo de una lipasa con especificidad por posiciones *sn*-2 es la lipasa de *Geotrichum* sp. (Borrelli and Trono, 2015). y, como mostraremos en esta Tesis, la lipasa versátil de *O. piceae*, sin ser selectiva, muestra una preferencia por esta posición.

En cuanto a los modelos cinéticos que describen la acción de estas enzimas, debemos recordar que, al actuar sobre sustratos hidrófobos, en soluciones acuosas se suele encontrar un equilibrio entre monómeros, agregados, micelas y emulsiones. Si también consideramos que las lipasas actúan en la interfaz lípido/agua, es fácil comprender que estos sistemas no son homogéneos, por lo que su cinética no se ajusta exactamente a las ecuaciones de Michaelis-Menten (Jaeger and Reetz, 1998), aunque pueden describirse mediante parámetros y modelos similares (por eso se habla de constantes cinéticas aparentes). Las reacciones catalizadas por lipasas son reacciones bi-sustrato, y los sustratos pueden unirse a la enzima: a) simultáneamente antes de formar productos (mecanismo de complejo ternario), o b) acoplarse de forma secuencial



(mecanismo Ping-Pong Bi-Bi) (Corradini *et al.*, 2019; Monti *et al.*, 2018). Este último es el modelo cinético más frecuentemente aceptado y aplicado para describir la acción de las lipasas (Corradini *et al.*, 2019; Stergiou *et al.*, 2013).

El mecanismo de hidrólisis o formación de ésteres se puede definir como un proceso de acilación y desacilación de la enzima, que tiene lugar en cuatro pasos (Figura 1.3). Primero el éster se une a la Ser catalítica, dando lugar a un intermediario tetraédrico estabilizado por los residuos catalíticos His y Asp. A continuación, se libera el alcohol y se forma un complejo acil-enzima covalente, en el que el ácido esterifica a la Ser. El ataque de un aceptor nucleófilo (agua en la hidrólisis o, por ejemplo, un alcohol o un éster en la transesterificación) forma un nuevo intermediario tetraédrico estabilizado en el oxianión. En la última etapa, se libera el producto (un ácido o un éster) y la enzima queda de nuevo disponible (Bornscheuer, 2002; Borrelli and Trono, 2015; Jaeger and Reetz, 1998; Kang *et al.*, 2011).

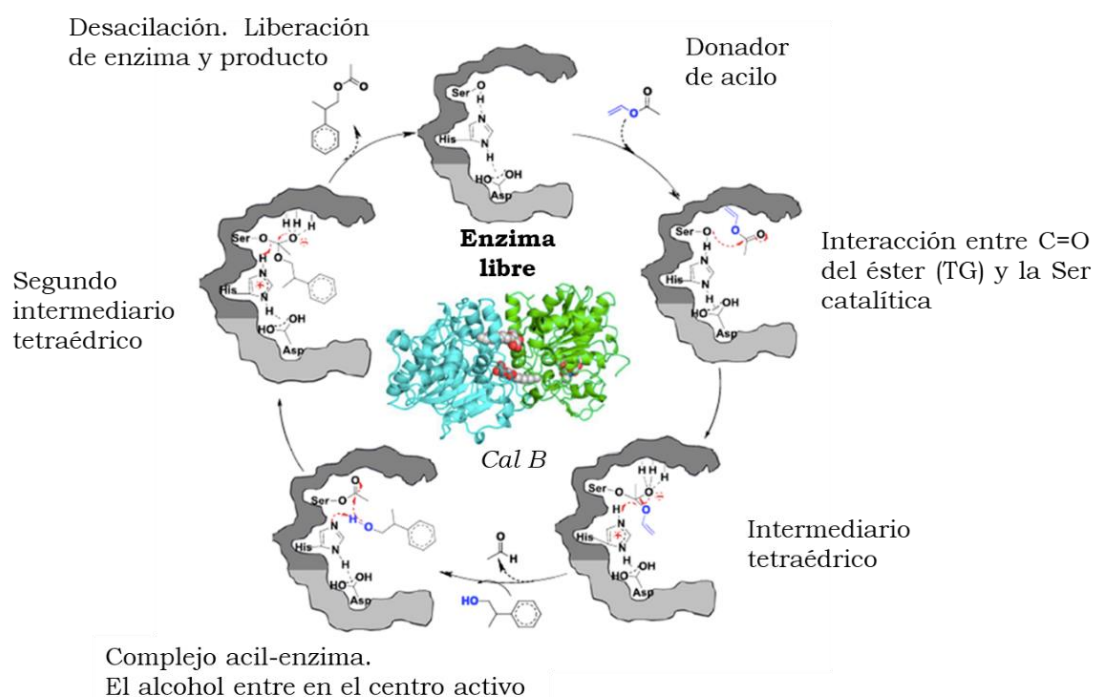


Figura 1.3. Modelo del mecanismo de acción de las lipasas, utilizando como ejemplo la enzima Cal B® de *C. antarctica*. Se muestran los cuatro estadios

de la enzima durante el proceso catalítico. Modificado de Sen and Puskas (2015).

#### 1.2.4. Lipasas para biocatálisis

El empleo de enzimas nativas para uso industrial presenta varias desventajas. En general, en el proceso de producción los rendimientos son bajos y poco reproducibles, y hay que cultivar el microorganismo en medios complejos que, generalmente, incluyen un inductor que además actúa como fuente de carbono (lípidos, en el caso de las lipasas). Además, en estas condiciones se pueden producir isoformas con diferente comportamiento catalítico, pero a veces con características muy similares, y su purificación es difícil y costosa (Valero, 2012). Por estas razones, para la biocatálisis a escala industrial es conveniente producir lipasas recombinantes, utilizando sistemas de expresión heteróloga que permitan obtener la proteína deseada en su forma activa y con alto rendimiento.

Los hospedadores se agrupan en dos categorías principales: procariotas como *Escherichia coli* o *Bacillus*, y eucariotas, entre los que destacan levaduras y hongos filamentosos pero también células de mamífero y sistemas de expresión en células de insecto con baculovirus (Borrelli and Trono, 2015; Valero, 2012). Los genes de lipasas eucarióticas se suelen expresar en hospedadores eucariotas, ya que estos pueden realizar modificaciones postraduccionales a lo largo de la ruta secretora, rindiendo proteínas correctamente plegadas. Las levaduras son generalmente los organismos de elección y, entre ellas, la más utilizadas son *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, aunque la última con mayor éxito porque produce mayores niveles y secreta pocas proteínas propias y, entre ellas ninguna lipasa (Barriuso *et al.*, 2016; Borrelli and Trono, 2015).

Por otro lado, la **ingeniería de proteínas** es una herramienta de gran utilidad para mejorar determinadas propiedades de las enzimas (eficiencia catalítica, termoestabilidad, especificidad de

sustrato, selectividad...) de cara a su aplicación biotecnológica. Dentro de estas técnicas existen dos estrategias principales:

*i) Diseño racional*

Consiste en la mutagénesis de aminoácidos o regiones definidas en la secuencia de la proteína, para lo que se requiere conocer su estructura tridimensional y las relaciones estructura-función (Borrelli and Trono, 2015; Khan *et al.*, 2017). Según las propiedades que se quieran modificar, se deberá introducir la mutación en una u otra región de la proteína. En el caso de las lipasas, los principales objetivos de este tipo de ensayos son mejorar sus propiedades catalíticas, selectividad, especificidad o termoestabilidad, mediante distintas estrategias (Khan *et al.*, 2017):

- Cambios en el dominio de la tapa y la región bisagra: para que la proteína modificada adquiriera propiedades de la lipasa que proporciona la zona que se intercambia (Akoh *et al.*, 2004; Secundo *et al.*, 2004; Skjøl *et al.*, 2009).
- Modificaciones en el centro activo: cambiando aminoácidos que pueden mejorar la actividad catalítica (Gupta *et al.*, 2015).
- Cambios en la forma, tamaño y/o hidrofobidad de la zona de unión al sustrato: pueden afectar a la quimio- y la enantioselectividad de la enzima (Brundiek *et al.*, 2012; Schmitt *et al.*, 2002).
- Mutaciones en regiones de la superficie: pueden afectar a la distribución de cargas superficiales y por tanto modificar propiedades que influyen en la estabilidad frente a solventes orgánicos (Park *et al.*, 2012).
- Alteraciones en la flexibilidad o rigidez de la estructura que pueden influir en la termoestabilidad. Una estructura más rígida se asocia con una mejor estabilidad a altas temperaturas, mientras que la flexibilidad se asocia a bajas temperaturas de trabajo (Borrelli and Trono, 2015). Esto también se observa al inmovilizar.

*ii) Evolución dirigida*

Esta técnica, que combina mutagénesis al azar y selección, no precisa un conocimiento previo de la estructura de la proteína. Mediante mutaciones al azar en el gen codificante se reproduce la evolución natural, basada en la “supervivencia” del más apto, que es aquél que incorpora las mutaciones más adecuadas (Gupta *et al.*, 2015). Con esta estrategia, se obtienen variantes de la enzima y se genera una librería de mutantes. Estas mutaciones se pueden crear por PCR propensa a error, recombinación al azar, extensión escalonada o mediante recombinación aleatoria de cebadores. La identificación y selección de los clones, en los que se ha generado una mayor mejora en la propiedad deseada (estabilidad, especificidad, eficiencia...), se realiza, generalmente, mediante técnicas espectrofotométricas de alto rendimiento (*high throughput*). A pesar de que con esta técnica no es necesario que esté definida la estructura tridimensional de la enzima, como se ha mencionado anteriormente, ni su mecanismo catalítico, sí es necesario conocer la secuencia del gen codificante, tener un sistema de expresión adecuado (como *Saccharomyces cerevisiae* o *Yarrowia lipolytica*) y un método efectivo para crear bibliotecas de mutantes que luego se ensayan mediante un sistema de selección adecuado para seleccionar las variantes con mayor actividad, o la actividad deseada (Bornscheuer, 2002; Borrelli and Trono, 2015; Duquesne *et al.*, 2012).

Otra herramienta para estudiar, y así poder mejorar, el comportamiento de las enzimas se basa en las simulaciones computacionales mediante aproximaciones de **dinámica molecular**. Estos métodos pueden predecir los cambios que experimenta la enzima a diferentes pHs, temperaturas o en un solvente en concreto. En el caso de las lipasas se utiliza principalmente para analizar la interacción con una interfaz sustrato-agua, lo que da información sobre el mecanismo molecular, y para analizar el impacto de mutaciones en la tapa y regiones hidrofóbicas (sitio unión a sustrato o superficie), y guiar

el diseño de variantes mejoradas (Gruber and Pleiss, 2012; Khan *et al.*, 2017).

Por último, la **inmovilización** puede ser fundamental para la viabilidad económica de una enzima a nivel industrial. Además de favorecer su recuperación y reutilización, es una aproximación para modificar casi todas las propiedades enzimáticas ya que puede mejorar su estabilidad, haciéndolas más robustas y, por lo tanto, más resistentes a condiciones de reacción severas (Filho *et al.*, 2019; Mateo *et al.*, 2007). Puesto que una proteína inmovilizada puede tener propiedades distintas dependiendo del tipo de inmovilización, es importante ensayar distintas estrategias y disponer de una batería de biocatalizadores con diferentes propiedades para distintas aplicaciones (Mateo *et al.*, 2007; Sheldon and van Pelt, 2013). Más adelante comentaremos los distintos tipos de inmovilización, soportes, ventajas y desventajas, y algunos ejemplos de lipasas inmovilizadas para biocatálisis.

### **1.2.5. Principales aplicaciones industriales de las lipasas**

La producción y degradación de ésteres por biocatálisis se desarrolla en condiciones suaves y mediante procesos limpios, específicos y selectivos. Además de estas ventajas, inherentes a cualquier reacción enzimática, las aplicaciones industriales de las lipasas son innumerables tanto en hidrólisis como en síntesis, gracias a su robustez y versatilidad catalítica. La más utilizadas en biotecnología son de origen microbiano, y entre ellas podemos citar las lipasas fúngicas Cal B<sup>®</sup> de *C. antarctica*, las lipasas de *C. rugosa*, la RML<sup>®</sup>, la ROL<sup>®</sup> de *Rhizopus oryzae*, la TLL<sup>®</sup> de *T. lanuginosus* y la bacteriana BCL<sup>®</sup> de *Burkholderia cepacia* (Adlercreutz, 2013). En la Figura 1.4 se presentan algunos de los campos de aplicación más comunes para este tipo de enzimas.

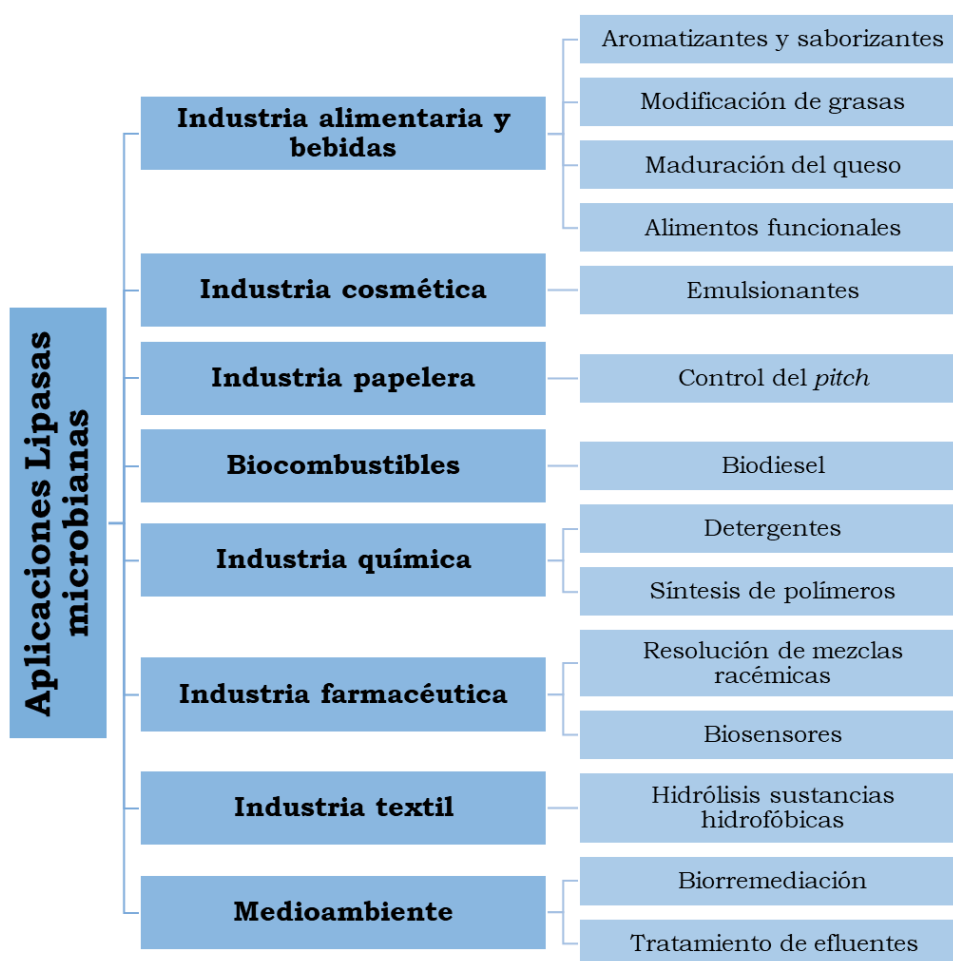


Figura 1.4. Aplicaciones industriales más habituales de las lipasas microbianas.

**Industria alimentaria y bebidas.** Se han utilizado lipasas microbianas para la hidrólisis de la grasa de la leche con el fin de aumentar el sabor de productos derivados del queso, y para la producción de aceites y grasas funcionales o enriquecidos incorporados a los preparados sustitutos de la leche materna o de la manteca de cacao (Ferreira-Dias *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2015).

Entre las aplicaciones más relevantes en este campo están dos de las evaluadas en esta tesis: la producción de ésteres de ácidos grasos volátiles (o de cadena corta) y la de ésteres de esteroides vegetales, cuyo interés explicaremos en más detalle a continuación. Los esteroides libres y los ésteres de ácidos grasos volátiles pueden extraerse de fuentes naturales, pero a muy baja



































































concentración, y para su uso industrial estos ésteres se obtienen generalmente por transformación química (Brault *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2008; Longo and Sanromán, 2006). Las condiciones de estos procesos, altas temperaturas y catalizadores no selectivos, generan productos secundarios no deseados (Ivić *et al.*, 2016; Khan and Rathod, 2015) por lo que los ésteres sintetizados químicamente no tienen la consideración de productos naturales (Longo and Sanromán, 2006; Martins *et al.*, 2013; SÁ *et al.*, 2017). En los últimos años ha crecido la importancia de los productos de origen biológico gracias a las preferencias manifestadas por los consumidores y a la existencia de normas que promueven la producción de compuestos naturales. Los ésteres producidos enzimáticamente sí cumplen con las normativas europeas y americanas para ser considerados compuestos naturales (Khan and Rathod, 2015; SÁ *et al.*, 2017) y, por tanto, el mercado de estos productos está en franca expansión.

Tabla 1.1. Características sensoriales de los ésteres de ácidos grasos volátiles en función de la longitud de la cadena del ácido graso y el alcohol utilizados.

Adaptado

de

<https://jameskennedymonash.wordpress.com/2013/12/16/infographic-table-of-esters-and-their-smells-v2-200-smells/>

		Alcohol							
		metanol	etanol	propanol	butanol	pentanol	hexanol	heptanol	octanol
Ácido carboxílico	metanoico								
	etanoico								
	propanoico								
	butanoico								
	pentanoico								
	hexanoico								
	heptanoico								
	octanoico								

Los ésteres de ácidos grasos volátiles contribuyen al aroma y sabor natural de las frutas y verduras, y se utilizan ampliamente como aditivos en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Khan and Rathod, 2015; SÁ *et al.*, 2017). Sus características sensoriales difieren en función de la longitud de la cadena del ácido y el alcohol (Tabla 1.1).

Hasta el momento, se han utilizado varias lipasas fúngicas (las de *C. rugosa*, Cal B<sup>®</sup>, RML<sup>®</sup>, ROL<sup>®</sup> y TLL<sup>®</sup>) para la síntesis de estos aditivos mediante esterificación directa de ácidos grasos volátiles y alcoholes (Ansorge-Schumacher and Thum, 2013; Ivić *et al.*, 2016; Khan and Rathod, 2015; Martins *et al.*, 2014).

Por otra parte, las lipasas también se emplean para la lipofilización de fitoesteroides, con el fin de facilitar su inclusión en alimentos grasos y de mejorar las propiedades de sus precursores (Borrelli and Trono, 2015; Lai *et al.*, 2019). Los fitoesteroides y fitoestanoles (formas saturadas de los fitoesteroides) son sustancias bioactivas, con efecto hipocolesterolémico, que se encuentran en los frutos, semillas, hojas y tallos de casi todos los vegetales conocidos. Su estructura química, similar a la del colesterol, parece ser la responsable de sus efectos beneficiosos, y se ha descrito que los estanoles y sus ésteres son más efectivos reduciendo los niveles de colesterol LDL, tanto exógeno como endógeno, que los esteroides y sus ésteres (16,4-17,1% frente a 8,3-8,4%) (Cusack *et al.*, 2013; Musa-Veloso *et al.*, 2011). Existen varias teorías sobre su mecanismo de actuación, como la formación de micelas mixtas en el proceso de digestión que impiden su absorción o la competencia de ambos esteroides por los mismos receptores debido a su analogía estructural (Figura 1.5) (López Luengo, 2005; Ostlund, 2007). Sin embargo, la ingestión de fitosteroides a través de aceites vegetales, semillas y cereales, es insuficiente para producir estos efectos beneficiosos, por lo que se incorporan a la dieta a través de alimentos funcionales (nutracéuticos) (Wildman and Kelley, 2007).



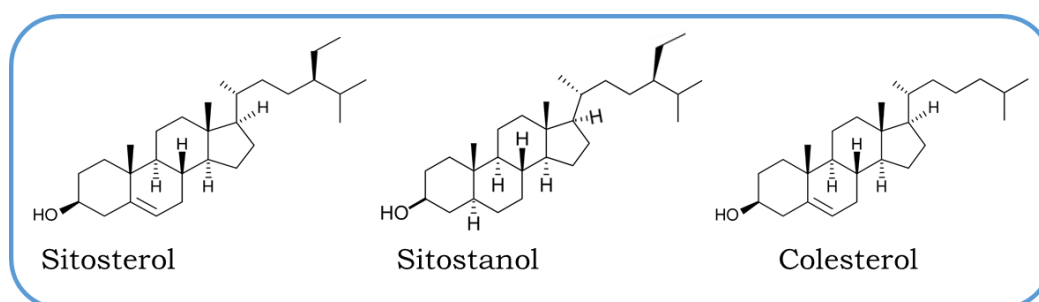


Figura 1.5. Estructura química general de fitoesteroles, fitoestanoles y colesterol.

El uso de esteroides y estanoles libres como complementos dietéticos está limitado por su alto punto de fusión y su baja solubilidad en agua y grasa, pero su conversión en ésteres de ácidos grasos de cadena media o larga modifica sus propiedades físicas. Los ésteres son más biodisponibles, tienen consistencia semilíquida y propiedades comparables a las de las grasas y aceites comestibles. Todo esto facilita su incorporación a alimentos grasos como mantequillas y yogures. Para su síntesis enzimática, se han ensayado varios preparados comerciales que contienen lipasas microbianas (Maeda *et al.*, 2008; Negishi *et al.*, 2003; Tôke *et al.*, 2007; Torrelo *et al.*, 2012; Villeneuve *et al.*, 2005; Vu *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2001a) y existen varias patentes al respecto (Barba *et al.*, 2011; Basher and Plat, 2004; Norinobu *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2006; Soe and Joergensen, 2010).

**Industria cosmética.** Las lipasas pueden incluirse como ingredientes activos en formulaciones cosméticas, principalmente para limpieza o para la liberación controlada *in situ* de un ingrediente activo, o emplearse como biocatalizadores en la síntesis de productos específicos, como ésteres con propiedades emulsionantes, aromas y compuestos bioactivos (Ansorge-Schumacher and Thum, 2013; Borrelli and Trono, 2015). Algunos ejemplos de sustancias en cosméticos sintetizadas por lipasas son derivados del retinol, cremas

antiobesidad y preparados para la ondulación del cabello (Hasan *et al.*, 2006).

**Industria papelera.** Las lipasas se utilizan de forma rutinaria para eliminar depósitos lipídicos indeseados (triglicéridos y ésteres de esteroides) formados durante la producción de pastas de papel, conocidos como *pitch* (Gutiérrez *et al.*, 2001), lo que ha permitido crear métodos de blanqueo más respetuosos con el medio ambiente. En la industria del papel reciclado, también pueden participar en la eliminación de *stickies*, producidos por la deposición de restos de adhesivos y otros productos (Cedillo *et al.*, 2013), y en el destintado (Hasan *et al.*, 2006).

**Biocombustibles.** Mediante transesterificación/esterificación catalizada por lipasas se puede obtener biodiesel. Este biocombustible es un líquido no tóxico y biodegradable, compuesto de ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena larga, y obtenido a partir de recursos renovables. Tiene propiedades de combustión comparables a las del diésel convencional, y su uso en mezclas mejora la eficiencia del motor y reduce el consumo de combustible. Cuando se utiliza en mezclas, también se reducen las emisiones de partículas, hidrocarburos, CO, CO<sub>2</sub>, SO<sub>x</sub>, y el NO<sub>x</sub> liberado (Suresh *et al.*, 2018). El biodiesel suele producirse químicamente mediante alcoholisis de triglicéridos con un alcohol de cadena corta, catalizada por ácidos o bases a altas temperaturas (Al-Zuhair, 2007). Sin embargo, la biocatálisis se está convirtiendo en una alternativa ecológica y eficiente a nivel industrial, y es otra de las aplicaciones estudiadas en esta tesis.

La viabilidad económica de estos procesos depende, en gran medida, del precio de la materia prima, que debería representar menos del 50% de los costes de producción (Jamil *et al.*, 2018). Las tecnologías de primera generación (1G), basadas en el empleo de aceites de semillas, proporcionan la mayor parte de los combustibles líquidos obtenidos en la actualidad a partir de biomasa, pero son éticas, ambientales y económicamente insostenibles. Sin embargo, se pueden utilizar residuos lipídicos,

como aceites de cocina usados y grasas animales, como materias primas renovables y competitivas para producir biodiesel 2G. Si combinamos el empleo de un proceso verde con el uso de residuos urbanos o industriales (como aceites de cocina usados) como sustratos, tendremos un bioproceso limpio, selectivo y económicamente viable.

Aparte de las ventajas medioambientales del proceso enzimático frente al químico, hay que destacar que: a) las enzimas son selectivas, y generan exclusivamente los productos esperados, rindiendo una mezcla de ésteres y glicerol; b) este glicerol está limpio (Christopher *et al.*, 2014), y puede utilizarse para otras aplicaciones; y c) en el proceso enzimático los ácidos grasos libres también se esterifican (Borrelli and Trono, 2015; Gupta *et al.*, 2015; Hasan *et al.*, 2006), contribuyendo a los rendimientos finales y facilitando la purificación posterior de los ésteres (Luna *et al.*, 2017).

El coste de los biocatalizadores y su posible inhibición por los alcoholes de cadena corta y el glicerol son dos de las principales limitaciones para la aplicación industrial del proceso enzimático. Sin embargo, una enzima inmovilizada que mantenga o mejore la actividad catalítica de su forma soluble y que pueda reutilizarse a lo largo de sucesivos ciclos de síntesis evita esa limitación (Miao *et al.*, 2018; Tacias-Pascacio *et al.*, 2017, 2016).

**Industria química.** Una de las aplicaciones más importantes de las lipasas es la producción de jabones y productos de limpieza, también incorporándolas directamente a las formulaciones de detergentes junto con proteasas, amilasas y celulasas, para eliminar manchas de grasa. Las lipasas utilizadas en este caso suelen ser estables a altas temperaturas y medios alcalinos (Hasan *et al.*, 2006). Las ventajas de su uso son múltiples ya que al ser biodegradables se reduce el impacto negativo de los detergentes en las aguas residuales y permite reducir el uso de compuestos químicos (Borrelli and Trono, 2015).

Otra aplicación muy en auge actualmente es la producción de biopolímeros biobasados y biodegradables de forma altamente selectiva (Casas-Godoy *et al.*, 2012; Jaeger and Eggert, 2002). Por ejemplo, el ácido poliláctico se sintetiza enzimáticamente mediante polimerización por apertura de anillo de lactonas y por policondensación (Chuensangjun *et al.*, 2012; Yeniad *et al.*, 2011).

**Industria farmacéutica y médica.** La estereoespecificidad y enantioselectividad de muchas lipasas permite sintetizar ingredientes farmacéuticos activos enantiopuros o sus intermediarios mediante resolución racémica. Como ejemplos, mencionaremos los intermediarios en la síntesis del antihipertensivo Captopril o del anticancerígeno Paclitaxel o compuestos activos como el flurbiprofeno (Gupta *et al.*, 2015; Hasan *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2019). En el ámbito médico, se utilizan lipasas inmovilizadas sobre electrodos de pH/oxígeno, en combinación con otras enzimas o no, como biosensores que detectan lípidos, triglicéridos y colesterol en sangre, además, también se administran como complemento alimenticio para mejorar la digestión (Hasan *et al.*, 2006).

**Industria textil.** El desengrasado es una etapa esencial en la preparación de materias primas grasas, como las pieles y cueros de origen animal. Gracias a las lipasas el acabado de estos productos tiene una apariencia más limpia y un color más uniforme, se mejoran las propiedades hidrofóbicas del cuero, y el proceso es más eficiente y respetuoso con el medio ambiente (Hasan *et al.*, 2006).

**Medioambiente.** En biorremediación, se utilizan microorganismos productores de lipasas para degradar contaminantes como aceites, hidrocarburos, plásticos y pesticidas (Hasan *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2020). Además, residuos grasos de distintas industrias pueden ser utilizados como sustratos por las lipasas, en un contexto de economía circular, generando nuevos productos con un valor añadido. Un ejemplo de ello se ha estudiado en esta Tesis, utilizando un aceite

de cocina usado para la síntesis de distintos compuestos con aplicación industrial.

### 1.2.6. Lipasas utilizadas en este trabajo

Para la realización de esta Tesis se han seleccionado varias lipasas comerciales no regioselectivas, aplicadas en numerosos bioprocesos, para compararlas con la lipasa versátil de *O. piceae* expresada en *P. pastoris* (OPeR). La mayoría de ellas se han inmovilizado y empleado en algunas de las aplicaciones evaluadas. En la Tabla 1.2 se resumen las características más importantes de estas lipasas.

**Lipasas A y B de *C. antarctica*.** La levadura *C. antarctica* fue aislada del lago hipersalino Vanda (Antártida) en 1960. A partir de ella se caracterizaron y purificaron las lipasas A (Cal A®) y B (Cal B®), que posteriormente fueron clonadas y sobreexpresadas en *Aspergillus oryzae* por Novo Nordisk (ahora Novozymes) (Wikmark, 2015).

- **Cal A®.** Esta isoenzima cuya homología de secuencia con otras  $\alpha/\beta$ -hidrolasas es baja, destaca por su elevada estabilidad térmica y a pH ácido (Wikmark, 2015). Posee una tapa de 92 residuos, tiene dos láminas  $\beta$  C-terminales y muestra moderada activación interfacial. En el centro activo, la zona de unión al sustrato tiene forma de túnel y por sus dimensiones puede aceptar ácidos grasos de cadena larga. El sitio de unión del alcohol es amplio, permitiendo el acceso de sustratos voluminosos (incluso alcoholes terciarios). En la hidrólisis de triglicéridos, tiene preferencia por la posición sn-2. Esta preferencia no se ha observado en interesterificaciones, pero sí esterifica preferentemente las formas trans- más comunes de los ácidos grasos (Domínguez de María *et al.*, 2005; Ericsson *et al.*, 2008; Widmann *et al.*, 2010). Cal A® se ha utilizado para la preparación de compuestos enantioméricamente puros, como  $\beta$ -aminoácidos o ésteres (Domínguez de María *et al.*, 2005; Hari Krishna *et al.*, 2002; Wikmark, 2015) y en las industrias del papel y textil, para hidrolizar triglicéridos de ácidos grasos y






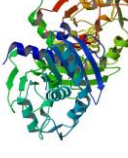
ésteres de resina de muy alto punto de fusión (Kirk and Christensen, 2002).

- **Cal B<sup>®</sup>**. Esta enzima es quizás la más conocida y utilizada en aplicaciones industriales. De tamaño mucho menor, su termoestabilidad a 70 °C es muy inferior. Hay que destacar que Cal B<sup>®</sup> tiene una tapa peculiar, tan pequeña que no llega a ocluir la entrada al centro activo, y se discute si presenta o no actividad interfacial.

El centro activo es de tipo hendidura y se ha observado su preferencia por la posición sn-3 en la hidrólisis de triglicéridos. Por alto grado de regio- y enantioselectividad, se ha utilizado intensamente para acilación de carbohidratos, resolución de alcoholes, aminas y ácidos racémicos, o preparación de compuestos ópticamente activos (Kirk and Christensen, 2002). Novozym 435 es la forma comercial de Cal B<sup>®</sup> inmovilizada mediante adsorción sobre un polímero macroporoso, y es la preparación de lipasa inmovilizada más descrita en la literatura (Ortiz *et al.*, 2019).

**Eversa<sup>®</sup>**. En esta Tesis se ha utilizado el preparado comercial Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0 (NS-40116), desarrollado por Novozymes y lanzado al mercado en 2014 para la síntesis de biodiesel a partir de aceites usados. Eversa<sup>®</sup> contiene un extracto crudo de una versión de la lipasa TLL<sup>®</sup>, modificada genéticamente y producida en *A. oryzae* (Fraga *et al.*, 2019; Gutiérrez-Lazaro *et al.*, 2018; Price *et al.*, 2016). No hay información estructural disponible acerca de esta enzima comercial, sin embargo, Fraga *et al.* (2019) determinaron por MALDI-TOF-MS que la masa molecular de la proteína monoglicosilada es 31,6 kDa, lo que coincide con lo descrito por Gonçalves *et al.* (2014) para la lipasa de *T. lanuginosus* monoglicosilada (31,5 kDa). Debido a su actividad y eficiencia en la síntesis de biodiesel, varios trabajos recientes tratan la inmovilización de Eversa<sup>®</sup> (Arana-Peña *et al.*, 2018; Facin *et al.*, 2018; Remonatto *et al.*, 2018).

Tabla 1.2. Estructura y principales características de las lipasas utilizadas en esta Tesis, \*aunque se observan fenómenos de hiperactivación (<sup>4</sup>Arana-Peña *et al.*, 2019; <sup>2</sup>Barba Cedillo *et al.*, 2012; <sup>3</sup>Brocca *et al.*, 2003; <sup>1</sup>Calero-Rueda *et al.*, 2002b; <sup>4</sup>Dimitrijević *et al.*, 2012; <sup>6</sup>Fernandez-Lafuente, 2010; <sup>2</sup>Gutiérrez-Fernández *et al.*, 2014; <sup>5</sup>Kirk and Christensen, 2002; <sup>5</sup>Skjøt *et al.*, 2009; <sup>3</sup>Vaquero *et al.*, 2016; <sup>4</sup>Wikmark, 2015; <sup>6</sup>Xu, 2000).

	OPE <sup>1</sup>	OPEr <sup>2</sup>	CRL <sup>3</sup>	Cal A <sup>4</sup>	Cal B <sup>5</sup>	TLL <sup>6</sup>
						
<b>Masa molecular (kDa)</b>	56,5	75	57-61	45	33	31.7
<b>Glicosilación</b>	8%	28%	-	-	-	-
<b>Punto isoelectrico (pI)</b>	3,3	-	4,5-5,7	7,5	6	4,4
<b>Activación interfacial</b>	No*	No*	Sí	Sí (baja)	No	Sí
<b>Triada catalítica</b>	Ser-Glu-His	Ser-Glu-His	Ser-Glu-His	Ser-Asp-His	Ser-Asp-His	Ser-Asp-His
<b>Centro activo</b>	Túnel	Túnel	Túnel	Túnel	Embudo	Hendidura
<b>Tapa</b>	37 aa	37 aa	varia	92 aa	5 aa	8 aa
<b>Forma dímeros</b>	Sí	Sí	Lip3 sí	Sí	No	Sí
<b>Estereoespecificidad</b>	-	sn-2	No	sn-2/No	sn-1,3/No	sn-1,3
<b>T<sub>a</sub> optima</b>	60 °C	25 °C	varia	60 °C	-	55-60 °C
<b>pH óptimo</b>	6-8	7,5-8	varia	7	7	9



**Lipasas de *C. rugosa* (CRL)**. Hasta el momento se ha establecido que existen 7 genes involucrados en la producción de lipasas por *C. rugosa*. Cinco de ellas están bioquímicamente caracterizadas (Lip1-Lip5, denominadas también CRL1-CRL5), y los preparados comerciales contienen una mezcla de isoenzimas, aunque en diferentes proporciones (siendo CRL1 la mayoritaria), además de otras proteínas (normalmente menos del 10%) y de estabilizadores como la lactosa (Domínguez de María *et al.*, 2006b). Estas isoenzimas tienen una alta identidad de secuencia (77-88%). A pesar de su similitud, su estabilidad a pH y temperatura, y su especificidad de sustrato difieren (Barriuso *et al.*, 2016). Todo esto, junto a las diferencias entre los preparados comerciales, conllevan problemas para su utilización en bioprocesos. Sin embargo, es uno de los biocatalizadores más frecuentemente usados para la resolución de mezclas racémicas (Domínguez de María *et al.*, 2006a).

**Lipasa versátil de *O. piceae* (OPE y OPEr)**. El hongo ascomiceto dimórfico *O. piceae* fue aislado a partir de muestras de madera en nuestro laboratorio, y seleccionado por presentar actividades lipasa y esterol esterasa. Estas actividades se deben a una única enzima, la lipasa versátil OPE, que inicialmente fue descrita como una esterol esterasa con actividad sobre triglicéridos (Calero-Rueda *et al.*, 2002b). El gen *ope* se clonó y se expresó en diferentes hospedadores heterólogos para producir la proteína, obteniendo los mejores resultados en *P. pastoris* (OPEr). Esta enzima es más estable a pH básico y, además, presenta mucha mayor eficacia catalítica que la enzima nativa, lo que se debe a que es más soluble y tiene una menor tendencia a agregar. Este incremento en solubilidad se debe a que OPEr presenta en su secuencia 6-8 aminoácidos más que OPE en el extremo N-terminal, consecuencia de la estrategia de clonación y de errores en el procesamiento de la proteína en *P. pastoris* (Vaquero *et al.*, 2016), por lo que se encuentra principalmente como monómero y dímero (Vaquero *et al.*, 2015a). No se ha observado activación interfacial en estas enzimas y, tras su cristalización, se describió que su centro activo tiene forma de



túnel (Gutiérrez-Fernández *et al.*, 2014). Antes de comenzar esta Tesis, OPE y OPEr ya se habían utilizado en la síntesis de ésteres de fitoesteroides (Barba *et al.*, 2011), la hidrólisis de triglicéridos y ésteres de esteroides (Calero-Rueda *et al.*, 2002a) y del polivinil acetato (Cedillo *et al.*, 2013) o la síntesis de  $\epsilon$ -caprolactona (Vaquero *et al.*, 2015b).

### 1.3. Inmovilización

Como ya hemos comentado, la inmovilización es una de las estrategias más exitosas dirigidas a mejorar el rendimiento de las enzimas para su uso industrial.

La inmovilización de la enzima se define como el proceso en el que una enzima soluble es “atrapada” para generar un catalizador enzimático insoluble, activo, estable y reutilizable. La aplicación de esta técnica va mucho más allá del reciclado de la enzima, puesto que tras un procedimiento apropiado de inmovilización se pueden mejorar propiedades tan importantes como su actividad catalítica, su estabilidad frente disolventes no acuosos, altas temperaturas o valores extremos de pH, su selectividad o su especificidad (Bernal *et al.*, 2018; Cao, 2005). Además, el uso de enzimas inmovilizadas facilita un buen control del proceso y permite recuperar el biocatalizador, minimizando o eliminando la contaminación del producto formado con proteína (Sheldon and van Pelt, 2013). Esto es especialmente importante si el compuesto sintetizado se destina a un uso alimentario, cosmético o farmacéutico, ya que se evita la alergenidad derivada de la absorción de los restos de catalizador (Ansorge-Schumacher and Thum, 2013). En el caso de las enzimas que actúan en medio orgánico, como las lipasas, se suma además el hecho de que la actividad de la enzima inmovilizada suele superar la de la enzima soluble en estas condiciones (Adlercreutz, 2013).

Para la inmovilización de enzimas pueden utilizarse muchas estrategias y soportes. De acuerdo con Bernal *et al.* (2018), el

desarrollo de un procedimiento de inmovilización implica (Figura 1.6):

- i. Selección de un soporte (material, estructura...) de bajo coste, con una química de superficie adecuada (funcionalización), que definirá el método de unión de la enzima.
- ii. Evaluación de las condiciones experimentales durante el proceso según el método elegido, a fin de optimizar el rendimiento (es decir, un alto rendimiento de inmovilización y una buena actividad).
- iii. Caracterización del comportamiento catalítico del biocatalizador resultante en condiciones operacionales.

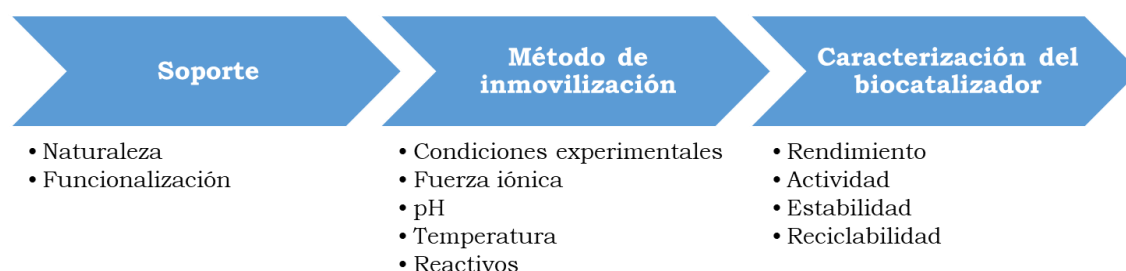


Figura 1.6. Esquema del procedimiento que debe seguirse para el desarrollo de un biocatalizador inmovilizado.

La elección del método de inmovilización y el soporte debe basarse en el compromiso entre actividad, estabilidad, facilidad de manipulación y coste. Sin embargo, no existe un método general aplicable para la inmovilización de cualquier enzima y, normalmente, se logra obtener el biocatalizador adecuado mediante ensayo y error (Hanefeld *et al.*, 2009), ya que el mejor procedimiento varía dependiendo de la enzima y la aplicación (Cao, 2005). Por tanto, cabe destacar la importancia de la ingeniería de biocatalizadores y la conveniencia de ensayar distintos métodos de inmovilización para seleccionar el más adecuado para una determinada aplicación (Cantone *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2007; Sheldon and van Pelt, 2013). Desde hace algunos años, mediante análisis *in silico* es posible

identificar residuos o dominios de la proteína implicados en la unión con el soporte y así predecir la posible conformación de la enzima inmovilizada (Talasaz *et al.*, 2006). Además, se pueden modelar las condiciones de inmovilización óptimas y las propiedades que debe tener el soporte (Martínez and Avila, 2012; Torres-Salas *et al.*, 2011a).

### 1.3.1. Soportes

El soporte es el material sobre el que se inmoviliza la enzima. Aunque en principio se pensaba que su papel se limitaba estrictamente al andamiaje para la inmovilización, actualmente se sabe que afecta al comportamiento y la aplicabilidad de la enzima (Cao, 2005), por lo que la selección del más adecuado es una decisión crítica (Santos *et al.*, 2015; Zdarta *et al.*, 2018). Los avances en las ciencias de materiales nos permiten disponer de un amplio rango de soportes de distinta naturaleza química, área superficial, geometría interna (por ej., porosidad), con diferentes grupos activos y resistencia mecánica (Santos *et al.*, 2015) y dotados de las características necesarias para este uso que se representan en la Figura 1.7 (Hanefeld *et al.*, 2009; Sirisha *et al.*, 2016; Zdarta *et al.*, 2018).



Figura 1.7. Características esenciales de los materiales usados como soporte para la inmovilización de enzimas. Modificado de Zdarta *et al.* (2018).

Desde hace algunos años, se ha despertado un gran interés en el uso de nanomateriales (nanopartículas, nanotubos, materiales mesoporosos y membranas de nanofibras) como soportes de inmovilización (Cipolatti *et al.*, 2016). Estos materiales tienen una gran área superficial y, en la mayoría de los casos, no tienen poros, de modo que las enzimas se disponen en su superficie evitando que se produzcan problemas de difusión interna. Además, permiten la unión de la enzima por múltiples puntos, haciéndola más estable (Garcia-Galan *et al.*, 2011). En función de su naturaleza química, podemos clasificar los soportes en dos grandes grupos: orgánicos e inorgánicos (Guisan, 2006).

**Orgánicos.** Esta categoría agrupa biopolímeros y polímeros sintéticos obtenidos de fuentes naturales renovables. Los biopolímeros incluyen polisacáridos (como la celulosa, quitina, quitosanos y, sobre todo, alginato y agarosa) y proteínas (como la albúmina, el colágeno o la queratina). Por su bajo coste y su origen renovable, en los últimos años se está poniendo especial interés en el uso de celulosa como soporte, tanto en forma de microcelulosa como en forma de membranas (Jesionowski *et al.*, 2014). En cuanto a los soportes fabricados con polímeros sintéticos, su estructura y propiedades dependerán de su composición monomérica y de su funcionalización (Zdarta *et al.*, 2018). Entre los más conocidos están el poliestireno, el policloruro de vinilo (PVC), y otros comerciales como Amberlite, Sepabeads o Eupergit (Jesionowski *et al.*, 2014; Sirisha *et al.*, 2016; Zdarta *et al.*, 2018).

**Inorgánicos.** Estos soportes tienen una alta estabilidad frente a la degradación física, química y microbiana, pero su biocompatibilidad es limitada y tienen menor afinidad por las biomoléculas que los soportes orgánicos (Zdarta *et al.*, 2018). En este grupo, cabe destacar los soportes de sílice (silicagel, zeolita o nanopartículas), con -OH superficiales que facilitan su funcionalización (Sirisha *et al.*, 2016; Zdarta *et al.*, 2018) y los

soportes compuestos por óxidos metálicos. Entre ellos, son especialmente importantes los óxidos de hierro como la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), cuyas propiedades magnéticas permiten recuperar fácilmente el biocatalizador inmovilizado aplicando un campo magnético. Estos soportes pueden prepararse en forma de nanopartículas y es necesario recubrirlos con una capa, generalmente de sílice, para evitar su oxidación (Zucca and Sanjust, 2014). Las nanopartículas magnéticas (MNPs) tienen un comportamiento superparamagnético (solo se magnetizan en presencia de un campo magnético externo), una alta estabilidad mecánica y una baja porosidad, lo que reduce problemas estéricos (Bilal *et al.*, 2018).

Para mejorar las propiedades de los soportes suele ser necesario modificarlos con grupos reactivos. El tipo y la cantidad de grupos funcionales determinarán su carácter hidrófobo/hidrófilo, el tipo de interacción (covalente o por adsorción) que podrá establecer con la enzima (Zdarta *et al.*, 2018), y además estos grupos pueden actuar como brazo espaciador entre enzima y soporte proporcionando flexibilidad a la enzima (Shuai *et al.*, 2017).

### **1.3.2. Tipos de inmovilización**

Las técnicas disponibles para la inmovilización son variadas, y las propiedades del biocatalizador inmovilizado dependen de la interacción entre el soporte, la enzima y el método utilizado (Cantone *et al.*, 2013).

Para elegir el mejor método de inmovilización, además del soporte, han de tenerse en consideración las características de la enzima (tamaño, glicosilación, regiones hidrofóbicas...), el medio de reacción en el que se desarrollará la biocatálisis y la estabilidad de la enzima en las condiciones de inmovilización (Hanefeld *et al.*, 2009).

De forma básica, los métodos de inmovilización pueden clasificarse en físicos y químicos (Figura 1.8).

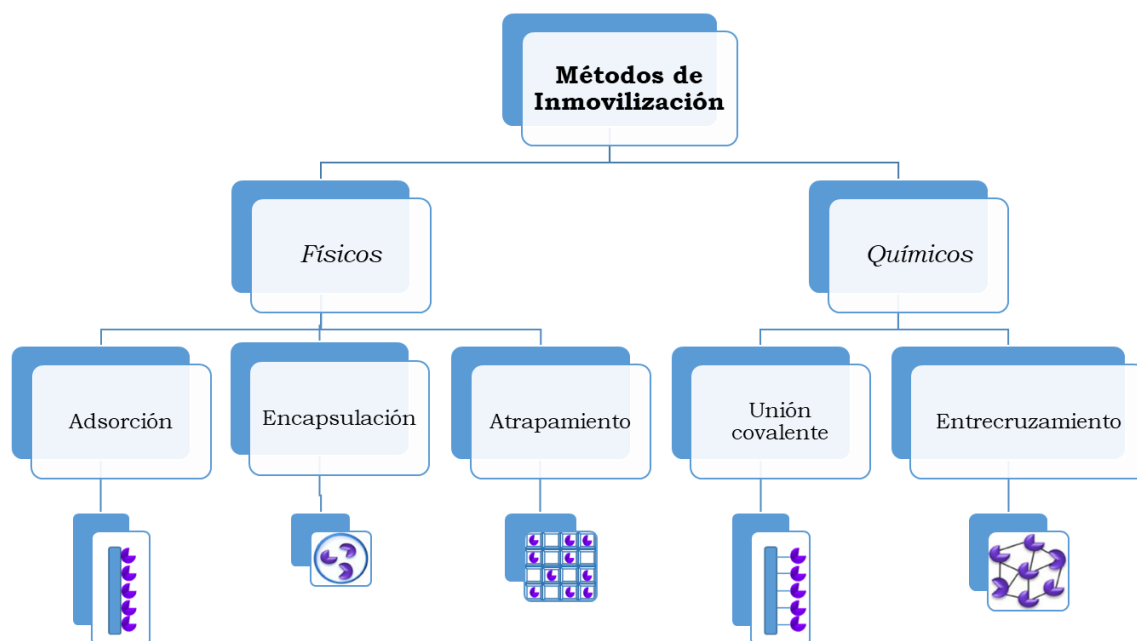


Figura 1.8. Clasificación de métodos de inmovilización de enzimas.

### **Métodos Físicos**

**Adsorción.** Estas interacciones físicas entre enzima y soporte se establecen mediante enlaces débiles, como puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o de van der Waals. Son reversibles, y pueden verse afectadas por cambios en la fuerza iónica del medio, el pH, la temperatura y el tipo de agitación, causando el lixiviado de las enzimas en medio acuoso. Una de sus ventajas es que no requieren la adición de agentes químicos, evitando así la modificación química de las enzimas (Filho *et al.*, 2019).

Por su relación con la presente Tesis, nos centraremos en la inmovilización sobre soportes hidrofóbicos. Este procedimiento es habitual para las lipasas, ya que éstas poseen regiones y/o dominios hidrofóbicos, como la tapa, que se pueden unir a la superficie hidrofóbica de un soporte, de modo que la lipasa queda inmovilizada en conformación activa. Esto se ha atribuido a su activación interfacial (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998), y se ha sugerido que el mecanismo de interacción entre la lipasa y el soporte hidrofóbico es más de pseudo-afinidad que de

hidrofobicidad (Rodrigues *et al.*, 2019). Una ventaja adicional de este tipo de inmovilización es que suele ir acompañada de la purificación de la lipasa, ya que en las condiciones utilizadas son las únicas proteínas que se fijan al soporte. No obstante, este sencillo y eficiente método tiene un gran inconveniente, que es la desorción de la enzima en determinadas condiciones de reacción, que trae consigo su inactivación operacional y la contaminación del producto (Garcia-Galan *et al.*, 2011; Weinberger *et al.*, 2018).

Encapsulación/atrapamiento. Estos métodos se basa en la retención de las enzimas en geles poliméricos porosos que permiten el paso de los sustratos y productos pero no de la enzima (Filho *et al.*, 2019). La encapsulación protege a la enzima del contacto directo con el medio de reacción, protegiéndola así de la inactivación. Sus principales desventajas son el lixiviado de la enzima y la resistencia a la transferencia de masa, que impide su aplicación con sustratos grandes (Brady and Jordaan, 2009; Filho *et al.*, 2019; Hanefeld *et al.*, 2009). Los hidrogeles, el quitosano, el alginato, la poliacrilamida y el sílica-gel están entre los polímeros más usados (Borges Reis *et al.*, 2019; Sheldon and van Pelt, 2013)

### **Métodos Químicos**

Unión covalente. Este método irreversible de inmovilización se basa en el establecimiento de uniones covalentes entre los aminoácidos activos localizados en la superficie de la proteína y los grupos funcionales unidos al soporte, y una de sus ventajas es que se evita la pérdida de enzima en el medio de reacción (Filho *et al.*, 2019; Sirisha *et al.*, 2016).

Tras su unión covalente, la enzima queda modificada fisicoquímicamente, y fijada al soporte en una conformación más o menos rígida. Las técnicas covalentes se basan habitualmente en procesos químicos relacionados con la formación de bases de Schiff o de enlaces amida, y para ello es necesario que la superficie del soporte disponga de grupos funcionales (amino, aldehído, carboxilo, epoxi...) que permitan establecer uniones covalentes con la proteína. Los compuestos más utilizados para



activar los soportes son el glutaraldehído y el glioxal, que también sirven como espaciadores (Borges Reis et al., 2019). En función de su longitud, permitirán una mayor o menor flexibilidad conformacional de la proteína. Los espaciadores largos pueden ser ventajosos para enzimas como las lipasas, que sufren cambios conformacionales significativos al interactuar con el sustrato, mientras que los cortos pueden conferir una mayor estabilidad térmica, ya que restringen la movilidad de la enzima e impiden su desnaturalización (Filho *et al.*, 2019; Hanefeld *et al.*, 2009). En cuanto a la enzima, los grupos más frecuentemente implicados en la formación de enlaces covalentes con el soporte son el  $\text{NH}_2$  del aminoácido N-terminal y los  $\epsilon$ -amino de las cadenas laterales de la lisina, los carbonilos  $\gamma$ - y  $\beta$ -de los ácidos aspártico y glutámico, los sulfhidrilo de la cisteína, los imidazol de la histidina, y el guanidino de la arginina. Si la enzima a inmovilizar es una glicoproteína, algo muy común en enzimas eucariotas extracelulares, se pueden oxidar sus cadenas glucídicas para generar aldehídos, empleándolos como puntos de anclaje al soporte activado con grupos  $-\text{NH}_2$  (Cao, 2005), aunque este es un método poco común.

El pH de inmovilización es importante para el ataque nucleofílico a un grupo epóxido o un aldehído sobre el soporte. En el caso del aldehído, la imina formada puede reducirse posteriormente (utilizando  $\text{NaBH}_4$ ) asegurando una inmovilización irreversible. Las carbodiimidas también pueden utilizarse, formando un enlace amida con un grupo ácido (Borges Reis et al., 2019; Hanefeld et al., 2009).

Por otra parte, la unión entre proteína y soporte puede producirse por múltiples puntos, lo que reduce su flexibilidad conformacional. Esto ocurre generalmente al inmovilizar enzimas sobre soportes funcionalizados con grupos aldehído (Borges Reis et al., 2019; Hanefeld et al., 2009), dando lugar a ordenaciones muy rígidas, capaces de mantener la estructura de la enzima sin cambios frente a agentes desnaturalizantes como el calor, los solventes orgánicos, pHs extremos y otros. Sin



embargo, también puede alterar el centro activo de la enzima, inactivándola (Filho *et al.*, 2019).

Entrecruzamiento. Este método de inmovilización, que no requiere soporte, utiliza un agente entrecruzante bifuncional que forma enlaces covalentes intra- e intermoleculares con grupos específicos de aminoácidos presentes en la superficie de la enzima. Las preparaciones de proteína entrecruzada pueden utilizar enzima cristalizada (*cross-linked enzyme crystals*, CLECs) o precipitada (*cross-linked enzyme aggregates*, CLEAs). Es este segundo tipo el que se ha hecho más popular, puesto que permite inmovilizar el 100% de la proteína sin cristalizarla (Cao *et al.*, 2000; Filho *et al.*, 2019; Schoevaart *et al.*, 2004; Sheldon, 2019). La agregación de la enzima se consigue mediante precipitación con sales (sulfato amónico), solventes orgánicos (acetona, alcoholes), polímeros no iónicos o ácidos (Hanefeld *et al.*, 2009), y es fundamental que este tratamiento no afecte a su estructura tridimensional para preservar su actividad (Cao *et al.*, 2000). En ocasiones, estos compuestos provocan una hiperactivación de la actividad enzimática, debido a cambios conformacionales inducidos por el estado de agregación (Schoevaart *et al.*, 2004). Por otra parte, entre los compuestos utilizados para el entrecruzamiento de las proteínas precipitadas podemos mencionar el glioxal, formaldehído o la etilendiamina (Borges Reis *et al.*, 2019) pero, sin duda, el glutaraldehído (GA) es el más empleado. Este reactivo, que interacciona con grupos  $\text{-NH}_2$  de aminoácidos localizados en la superficie, ha sido utilizado como agente entrecruzante durante décadas debido a su bajo coste y a su gran disponibilidad comercial. Sin embargo, es sumamente reactivo y es necesario optimizar su concentración, el tiempo de reacción y la relación GA:proteína para evitar la pérdida de actividad de la enzima (Borges Reis *et al.*, 2019).

Las CLEAs suelen tener una buena actividad catalítica y bajo coste de producción debido a la ausencia del soporte sólido (Filho *et al.*, 2019), aunque su robustez mecánica es escasa y al recuperarlas del medio de reacción por centrifugación o filtrado,

suelen compactarse y perder efectividad (Sheldon, 2019). Se han diseñado métodos destinados a optimizar estas preparaciones, incluyendo en su síntesis proteínas no catalíticas (por ejemplo, seroalbúmina bovina) para mejorar el entrecruzamiento y aumentar su porosidad para disminuir las limitaciones de transferencia de masa de los sustratos, o incluyendo un soporte para mejorar su recuperación y estabilidad operacional (Cao, 2005). En el caso de que el soporte sea magnético (mCLEAs) la recuperación resulta muy sencilla, incluso en presencia de otros materiales sólidos en la mezcla de reacción (Sheldon, 2019).

## ***2. Objetivos***



El objetivo general de esta tesis doctoral fue abordar la inmovilización de la lipasa versátil recombinante OPEr sobre nanopartículas para evaluar su aplicabilidad en tres bioprocesos de interés, comparándola con lipasas comerciales. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Síntesis y caracterización físico-química de soportes funcionalizados, magnéticos y no magnéticos, para la inmovilización de OPEr y varias lipasas comerciales.
2. Síntesis y caracterización de una batería de nanobiocatalizadores con OPEr inmovilizada.
3. Evaluación del potencial biotecnológico y reciclabilidad de los nanobiocatalizadores en reacciones de síntesis de interés industrial:
  - a. Síntesis de ésteres de ácidos grasos de cadena corta.
  - b. Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga (biodiesel) a partir de sustratos de origen renovable.
  - c. Síntesis de ésteres de  $\beta$ -sitoestanol mediante esterificación directa o transesterificación.



### ***3. Materiales y métodos***





### 3.1. Microorganismos

Las cepas CECT 20416 de *O. piceae* y GS115 de *P. (Komagataella) pastoris* (Invitrogen™) se utilizaron para la producción de las lipasas versátiles OPE y OPEr. La cepa de *P. pastoris* había sido previamente transformada con el vector pPIC9OPE (Invitrogen™), que contiene el gen *ope* que codifica la enzima (Gutiérrez-Fernández et al., 2014).

### 3.2. Medios de cultivo

Para el mantenimiento y crecimiento de *O. piceae* se utilizaron los medios ágar-malta y Czapeck-Dox modificado, respectivamente, de acuerdo con lo descrito por Calero-Rueda *et al.* (2002).

En el caso de *P. pastoris*, se siguieron los procedimientos descritos por Barba Cedillo *et al.* (2012). La cepa se mantuvo en placas con extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD) mientras que los preinóculos y el cultivo de la levadura para la producción de crudos de OPEr, se realizaron en extracto de levadura-peptona-sorbitol (YEPS).

### 3.3. Condiciones de cultivo y obtención de crudos enzimáticos

El cultivo del hongo y la producción de enzima se realizaron según se describe en Calero-Rueda *et al.* (2002b). *O. piceae* fue cultivado en medio Czapeck-Dox modificado a 28 °C y 150 rpm. Se preparó un inóculo de 5 días en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio, inoculados con una suspensión de micelio del hongo crecido en placas de agar malta. Para la producción de la enzima se inocularon matraces de 1 L con 200 mL de Czapeck-Dox, suplementado con aceite de oliva al 0,5% (v/v), con 4 mL de inóculo.

La cepa de *P. pastoris* productora de la lipasa OPEr se sembró en placas de YPD, manteniéndolas durante 48 h a 28 °C. A partir de estos cultivos se prepararon preinóculos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 20 mL de medio YEPS que se incubaron a 28 °C y 250 rpm durante 24 h. La producción de la lipasa versátil OPEr se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 1 L con 100 mL de medio YEPS, suplementado con metanol como inductor (0,5% p/v). Cada uno de los matraces se inoculó con 3,5 mL del preinóculo, manteniendo los cultivos a 28 °C y 250 rpm durante 96 h. Cada 24 h se adicionó 0,5% (p/v) de metanol, después de tomar una muestra de los cultivos para valorar el crecimiento del microorganismo (sección 2.5.1) y la producción de lipasa (sección 2.5.3). En este último caso, la muestra se centrifugó antes de determinar actividad enzimática en el sobrenadante.

Los cultivos se recogieron y centrifugaron en una centrífuga Sorvall RC5C, con un rotor SLA-1500, a 13.000 rpm durante 20 min, a 4 °C. La biomasa se descartó y los sobrenadantes se filtraron secuencialmente a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro 0,8-0,45-0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore), utilizando una bomba de vacío. Los sobrenadantes filtrados se concentraron por ultrafiltración, bajo presión de nitrógeno, a 4 °C, utilizando una célula de ultrafiltración Amicon YM3 con una membrana con un tamaño de poro de 50 kDa (Merck Millipore) para OPEr y de 30 kDa para OPE.

### **3.4. Lipasas comerciales**

En este trabajo se utilizaron varias lipasas comerciales, biotecnológicamente relevantes, para comparar los resultados con los obtenidos con la lipasa versátil OPEr. Para una de las aplicaciones, se utilizó una preparación comercial de la lipasa de *C. rugosa* (Lipasa tipo VII, Sigma-Aldrich) que contiene una mezcla de las distintas isoenzimas producidas por esta levadura. Probablemente, la más abundante es la isoenzima CRL1 que tiene poca actividad sobre ésteres de esteroides. Esta preparación

se empleó en experimentos preliminares y no se inmovilizó posteriormente. También se emplearon formulaciones líquidas de las lipasas A y B de *Candida antarctica* (NS 40020 = Cal A<sup>®</sup> y Lipozyme<sup>®</sup> = Cal B<sup>®</sup>), y Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0 (NS 40116), todas ellas donadas por Novozymes, y se inmovilizaron mediante algunos de los procedimientos que se describirán más tarde.

### **3.5. Determinaciones analíticas**

#### **3.5.1. Medida del crecimiento**

Para valorar el crecimiento de la levadura se tomaron muestras de los cultivos y se midió su turbidez (DO<sub>600</sub>) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

#### **3.5.2. Valoración de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó por el ensayo del ácido bicinconínico (BCA), utilizando los reactivos y el procedimiento descrito por Thermo Fisher Scientific (Pierce BCA *Protein Assay Kit*). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para construir una curva de calibrado, midiendo la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

De forma rutinaria, la cantidad de proteína se valoró midiendo la absorbancia a 280 nm (UV) usando un Nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific). Los aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano, fenilalanina) y los puentes disulfuro de las proteínas contribuyen a la absorción a esa longitud de onda (Gill and von Hippel, 1989).

#### **3.5.3. Valoración de actividad enzimática**

La actividad lipasa/esterasa se valoró, de forma rutinaria, en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,0 usando 1,5 mM de butirato de *p*-nitrofenilo (*p*NPB, Sigma-Aldrich) (Figura 3.1) como sustrato. Se midió la liberación de *p*-nitrofenol (*p*NP) a 410 nm ( $\epsilon_{410}$  = 15.200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) durante 1 min, en un espectrofotómetro

Shimadzu UV-160A. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto.

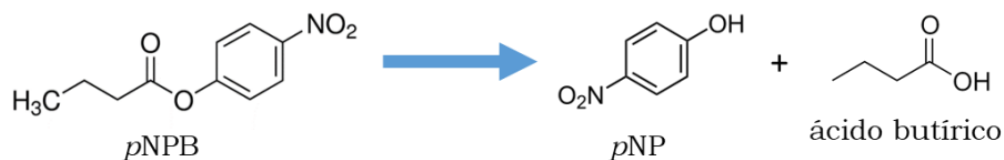


Figura 3.1. Reacción de hidrólisis del *p*NPB.

Tanto en los experimentos de inmovilización como en las aplicaciones biotecnológicas, con lipasas libres o inmovilizadas, realizadas a lo largo de este trabajo, las unidades de actividad enzimática se referirán a los valores calculados frente a este sustrato.

En cada una de las aplicaciones recogidas en esta Tesis se valoró la actividad de las lipasas mediante la cuantificación del producto de interés o de alguno de los sustratos, utilizando métodos cromatográficos (apartado 3.14).

### 3.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se llevó a cabo utilizando una cubeta Mini Protean II (BioRad) con geles de acrilamida al 10% de 1 mm de espesor, según el método descrito por Laemmli (1970). El potencial aplicado fue de 90 V durante el proceso de concentración de la muestra y de 200 V durante la separación.

Cada gel estaba compuesto de un gel separador (acrilamida 7,5% (p/v)-bisacrilamida 0,2% (p/v)), en la parte inferior y un gel de concentración (acrilamida 4% (p/v)-bisacrilamida 0,1% (p/v)), en la parte superior. La composición de los geles se indica en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición geles de electroforesis SDS-PAGE.

<b>Componentes</b>	<b>Gel separador (mL)</b>	<b>Gel concentrador (mL)</b>
Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5	1,3
Acrilamida 29%-bisacrilamida 0,8% (p/v)	3,3	0,7
SDS 10% (p/v)	0,1	0,05
Persulfato amónico 10% (p/v)	0,05	0,025
Tetrametiletilendiamina	0,005	0,005
Agua	4,0	2,9

Se cargaron en el gel 25  $\mu$ g de proteína total diluida en tampón de carga (Tabla 3.2) en una relación 1:4 y previamente tratada a 100 °C durante 10 min con el fin de provocar su completa desnaturalización.

Al concluir la electroforesis, se tiñeron los geles con una solución de Coomassie R-250 al 0,02% (p/v) en metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) durante 30 min. Posteriormente, se decoloraron con una solución de metanol, ácido acético y agua (30:10:60), que se reemplazó varias veces hasta visualizar las bandas de proteínas.

Como patrón de masa molecular se utilizó la mezcla comercial *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (BioRad) que contiene diez proteínas de masas moleculares comprendidas entre 10 y 250 kDa.

Tabla 3.2. Composición del tampón de carga.

Componentes	Cantidad
Tampón Tris-HCl 2,5 M pH 6,8	5,0 mL
Glicerol 85%	4,7 mL
SDS 20% (p/v)	20 mL
$\beta$ -mercaptoetanol	5 mL
Azul de bromofenol 0,2%	19 mg
Agua	15,3 mL

### 3.7. Soportes empleados para la inmovilización

Para la inmovilización de proteínas se utilizó un soporte comercial con un núcleo de magnetita recubierto de sílice, ya funcionalizado (ver sección 3.8.1), y dos tipos de micro/nanomateriales inorgánicos desnudos, que posteriormente fueron recubiertos y funcionalizados en el laboratorio:

➤ Partículas magnéticas comerciales de magnetita (MNPs) (Iolitec GmbH, Heilbronn, Alemania).

➤ En colaboración con el grupo TecnoEco, del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM, CSIC), liderado por el Dr. Félix López, se estudió la utilización de dos nuevos tipos de nanopartículas no magnéticas (G1 y G4), sintetizadas en su laboratorio a partir de material recuperado de pilas alcalinas desechadas. El procedimiento empleado para su síntesis, que se basa en la reutilización del zinc y manganeso que forman parte del ánodo y cátodo de estas pilas, y su aplicación como soporte para inmovilización de enzimas, se recoge en una patente con extensión internacional (Prieto *et al.*, 2019).

### 3.8. Funcionalización superficial de los soportes

Antes de inmovilizar las proteínas se modificó la superficie de los soportes seleccionados, con el fin de recubrir el núcleo metálico e incorporar grupos funcionales específicos que permitan unir las lipasas por un procedimiento concreto. Al final de esta sección, la Tabla 3.4 resume la información relativa a la funcionalización y denominación de los soportes utilizados.

#### 3.8.1. Funcionalización con grupos hidrofóbicos

Según descripción del fabricante, el soporte comercial SiMAG-Octyl® (Chemicell, Alemania) está formado por partículas con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , compuestas por un núcleo magnético recubierto de una capa de sílice funcionalizada con grupos octilo, que tienen un carácter hidrofóbico (Figura 3.2).

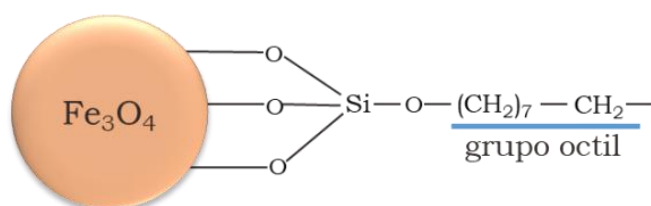


Figura 3.2. Esquema del soporte magnético comercial SiMAG-Octyl®.

#### 3.8.2. Funcionalización con grupos amino

El resto de los soportes funcionalizados, utilizados en este trabajo, se preparó en nuestro laboratorio a partir de las nanopartículas comerciales de magnetita (MNPs) y las no magnéticas sintetizadas por el grupo del CENIM (G1 y G4). En primer lugar se trataron los soportes desnudos con (3-aminopropil)triétosisilano al 99% (APTS, Sigma-Aldrich) según el protocolo descrito por Chen *et al.* (2013). Este compuesto añade una fina capa de sílice alrededor del núcleo de la nanopartícula y deja en su superficie grupos amino reactivos (Figura 3.3) que

reaccionarán con grupos aldehído para formar bases de Schiff y aminas secundarias.

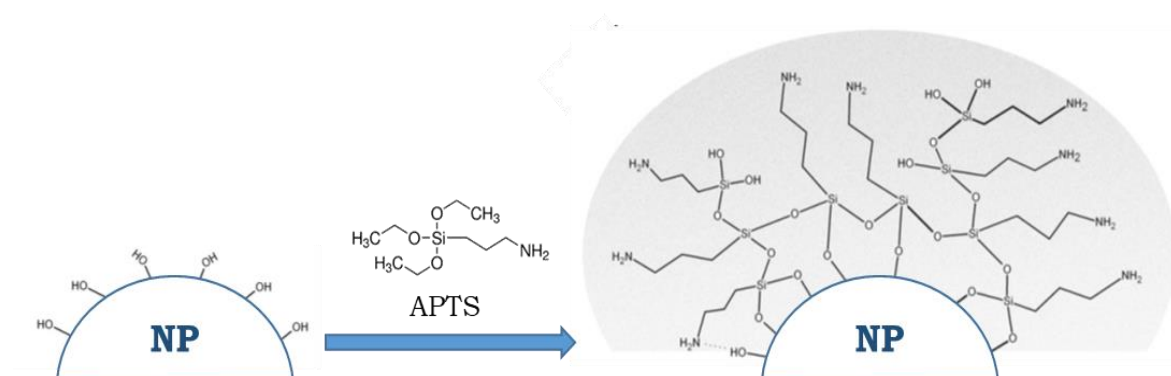


Figura 3.3. Tratamiento de las nanopartículas con APTS. Adaptado de Bini *et al.* (2012).

Para ello, 1 g (peso seco) de cada tipo de nanopartícula se incubó con 10 mL de APTS a una concentración 130 mM en metanol y se mantuvo 16 h en agitación a 80 rpm y 25 °C. Las nanopartículas funcionalizadas se lavaron tres veces con etanol al 50%, sonicando entre lavados en un baño de ultrasonidos (Selecta, España). Finalmente, se secaron a 65 °C en una estufa de aireación. Los soportes magnéticos aminados se denominarán AMNPs, y los no magnéticos AG1 y AG4 (Figura 3.4).

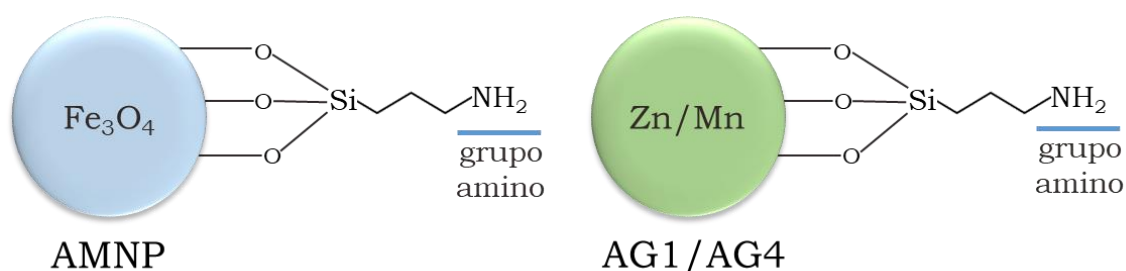


Figura 3.4. Esquema de las nanopartículas amino-funcionalizadas; AMNP, nanopartículas magnéticas y AG1/AG4, partículas no magnéticas.



Cuantificación de grupos  $-NH_2$  en la superficie de las nanopartículas. La cantidad de grupos amino anclada a la superficie de cada soporte se determinó según el protocolo de del Campo *et al.* (2005). Este método implica la reacción de los grupos  $NH_2$  del soporte con el reactivo 4-nitrobenzaldehído, en condiciones anhidro, para formar un grupo imina. Tras la eliminación del reactivo sobrante, se hidrolizan las iminas formadas, liberando el 4-nitrobenzaldehído previamente fijado, que se detecta espectrofotométricamente. El número de moléculas de aldehído liberadas es proporcional al número de grupos amino del soporte.

Las nanopartículas (5 mg) se lavaron cuatro veces con 1 mL de solución 0,8% (v/v) de ácido acético glacial en metanol, que es la solución de acoplamiento, en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Posteriormente, se añadió 1 mL de solución de 4-nitrobenzaldehído al 0,7% (p/v) en la solución de acoplamiento y se dejó reaccionar durante 3 h, en agitación a temperatura ambiente. Después se retiró el sobrenadante y se lavaron las nanopartículas, cuatro veces, con 1 mL de la solución de acoplamiento. Por último, se añadió 1 mL de solución de hidrólisis (75 mL de agua, 75 mL de metanol y 0,2 mL de ácido acético glacial) y se mantuvo durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm, en una MiniSpin (Eppendorf), y se recuperó el sobrenadante para medir la absorbancia a 282 nm. La cantidad de 4-nitrobenzaldehído, en la solución de hidrólisis, se calculó por interpolación en una curva de calibración construida a partir de soluciones estándar con distintas concentraciones de 4-nitrobenzaldehído.

### **3.8.3. Funcionalización con grupos aldehído superficiales**

Las nanopartículas previamente aminadas se trataron con glutaraldehído (GA, Sigma-Aldrich), un reactivo bifuncional (Figura 3.5), muy utilizado para este propósito (Barbosa *et al.*, 2014), ya que por uno de sus extremos se unirá a los grupos

amino disponibles en el soporte y, por el otro, a regiones reactivas de las proteínas en las condiciones de inmovilización.

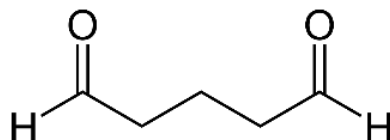


Figura 3.5. Estructura química del glutaraldehído (GA).

El tratamiento con GA se realizó a 25 °C y en condiciones de baja fuerza iónica, mediante dos procedimientos, partiendo de 1 g (peso seco) de nanopartículas amino-funcionalizadas. Los dos métodos empleados difieren fundamentalmente en la concentración de glutaraldehído y el pH de la reacción.

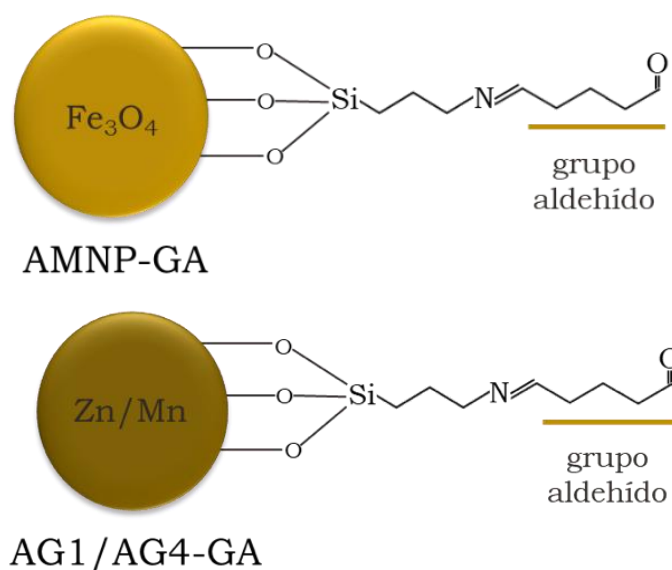


Figura 3.6. Esquema de las nanopartículas funcionalizadas con grupos aldehído

Procedimiento 1. Las nanopartículas (AMNPs, AG1 y AG4) se incubaron con una solución de glutaraldehído 250 mM en agua (40 mL) durante 3 h, a 25 °C y en agitación rotacional, en un mezclador Multi Bio RS-24 (Biosan) a 80 rpm. Las

nanopartículas modificadas con glutaraldehído (AMNPs-GA, AG1-GA y AG4-GA) (Figura 3.6) se lavaron seis veces con agua para eliminar el reactivo residual y una vez más con solución tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.

Procedimiento 2. El segundo procedimiento se empleó exclusivamente sobre AMNPs y se basa en el método descrito por Kim *et al.* (2010) para inmovilización de enzimas como mCLEAs, tal y como se describirá en la sección 3.9.2.3. En esta ocasión, se incubaron las AMNPs con glutaraldehído 50 mM en Tris-HCl 10 mM pH 8 durante 3 h a 25 °C y 200 rpm, lavando tres veces con el mismo tampón y una vez más con solución tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.

Tabla 3.4. Nomenclatura de los soportes empleados en esta Tesis para inmovilizar, según su funcionalización.

Soporte desnudo	Funcionalización en superficie	Nomenclatura
<b>Nanopartículas de magnetita (MNPs)</b>	Con grupos amino	AMNPs
	Con grupos aldehído	AMNPs-GA mCLEAs
	Con grupos octilo	SiMAG-Octyl
<b>Óxido mixto de Zn y Mn (G1)</b>	Con grupos amino	AG1
	Con grupos aldehído	AG1-GA
<b>Óxido mixto de Zn y Mn (G4)</b>	Con grupos amino	AG4
	Con grupos aldehído	AG4-GA

### 3.9.Métodos de inmovilización

En este trabajo se ha generado una batería de nanobiocatalizadores con actividad lipasa mediante la aplicación de diferentes métodos de inmovilización de la lipasa versátil

OPeR. Algunos de ellos se ensayaron también para las lipasas comerciales seleccionadas. Al final de la sección 3.9.2, la Tabla 3.5 resume el proceso de preparación de todos los nanobiocatalizadores sintetizados, incluyendo el soporte, su funcionalización, la proteína y el método de inmovilización, y la denominación del catalizador final.

### **3.9.1. Inmovilización no covalente (interacción hidrofóbica) sobre SiMAG-Octyl**

Este procedimiento se utilizó únicamente para inmovilizar OPeR sobre el soporte magnético SiMAG-Octyl<sup>®</sup>, funcionalizado con grupos octilo en su superficie. La solución comercial, que contenía 250 mg de SiMAG-Octyl<sup>®</sup>, se mezcló cuidadosamente durante 2 min, a temperatura ambiente, con crudos de OPeR con diferente carga enzimática: 4, 10, 14, 20 y 50  $\mu$ g de proteína/mg de soporte. El proceso se llevó a cabo en 5 mL de tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7. Tras recuperar los sobrenadantes, se midió la actividad y la concentración de proteína residual. Una muestra del sobrenadante fue analizada mediante SDS-PAGE (sección 3.6), con el fin de valorar la inmovilización selectiva de la lipasa en comparación con otras proteínas contenidas en el extracto enzimático crudo. El biocatalizador inmovilizado, al que denominaremos SiMAG-Octyl-OPeR (Tabla 3.5), se almacenó en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7 a 4 °C, hasta su uso.

### **3.9.2. Inmovilización covalente**

Se emplearon todos los soportes funcionalizados preparados en esta tesis, magnéticos o no, para inmovilizar OPeR covalentemente por varios métodos. El primero de ellos se basa en la unión entre los aldehídos colocados en la superficie de los soportes (por tratamiento con GA) y los grupos amino reactivos de la secuencia peptídica de la enzima. El segundo utiliza las cadenas glucídicas oxidadas de esta glicoenzima como brazos para el anclaje multipunto de la enzima, sin que la secuencia proteica se vea implicada en la interacción. El tercero involucra una primera interacción proteína-soporte (activado con GA), para a continuación precipitar y entrecruzar las proteínas que quedan

en solución junto con el soporte. Las enzimas comerciales Cal A<sup>®</sup>, Cal B<sup>®</sup> y Eversa<sup>®</sup> solo se inmovilizaron por los dos primeros procedimientos, sobre AMNPs y AMNPs-GA.

### **3.9.2.1. Unión covalente a nanopartículas aminadas mediante aldehídos generados en las cadenas glucídicas**

La mayoría de las proteínas secretadas por hongos filamentosos y levaduras son glicoproteínas profusamente glicosiladas (Doering *et al.*, 2015). A partir de estas cadenas glucídicas se pueden generar grupos aldehído libres mediante una reacción sencilla de oxidación con peryodato de sodio (NaIO<sub>4</sub>). Este compuesto produce la rotura del enlace carbono-carbono de los monosacáridos, entre carbonos adyacentes con grupos hidroxilo (dioles vecinales), abriendo el anillo y oxidando dichos alcoholes a aldehídos. Las enzimas utilizan esos nuevos grupos aldehído para interaccionar con el soporte aminado, formando una imina (base de Schiff), que se estabiliza mediante aminación reductiva para dar lugar a una amina secundaria estable (Nakamura *et al.*, 1976). La Figura 3.7 muestra esquemáticamente el procedimiento seguido para la inmovilización, que se explica en detalle a continuación.

Los extractos enzimáticos que contenían la enzima, OPEr o las enzimas comerciales (Cal A<sup>®</sup>, Cal B<sup>®</sup> y Eversa<sup>®</sup>), se trataron con NaIO<sub>4</sub> 10 mM, en Tris-HCl 5 mM pH 7, durante 3 h, a 4 °C, y luego se dializaron frente a Tris-HCl 20 mM pH 7, en un filtro de centrífuga Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) con un tamaño de corte de 30 kDa.

Una vez generados los grupos aldehído en los carbohidratos (CH) de las glicoenzimas, se procedió a su inmovilización. En primer lugar, se evaluó para OPEr la carga proteica óptima (proporción proteína/soporte) para el soporte AMNPs. Para ello, se mezclaron soluciones de OPEr tratada con periodato de sodio, con 4-70 µg de proteína/mg de soporte, con 1 g de AMNPs. La mezcla se resuspendió en Tris-HCl 100 mM, pH 8 con 150 mM de trimetil amino borano, un agente reductor suave que actúa

como estabilizador de iminas y permite realizar la reacción a pH moderado (Santos *et al.*, 2015). Las reacciones se agitaron a 100 rpm y 25 °C, durante 150 min, añadiendo la solución de lipasa en cinco pasos para evitar su desactivación por pH. Se separó el sobrenadante de las nanopartículas con la ayuda de un imán, para valorar actividad lipasa y proteínas solubles residuales. Finalmente, las nanopartículas con la lipasa inmovilizada se trataron con  $\text{NaBH}_4$  durante 1 h para formar la amina secundaria, tras lo cual se lavaron secuencialmente con Tris-HCl 100 mM pH 7 y Tris-HCl 20 mM pH 7.

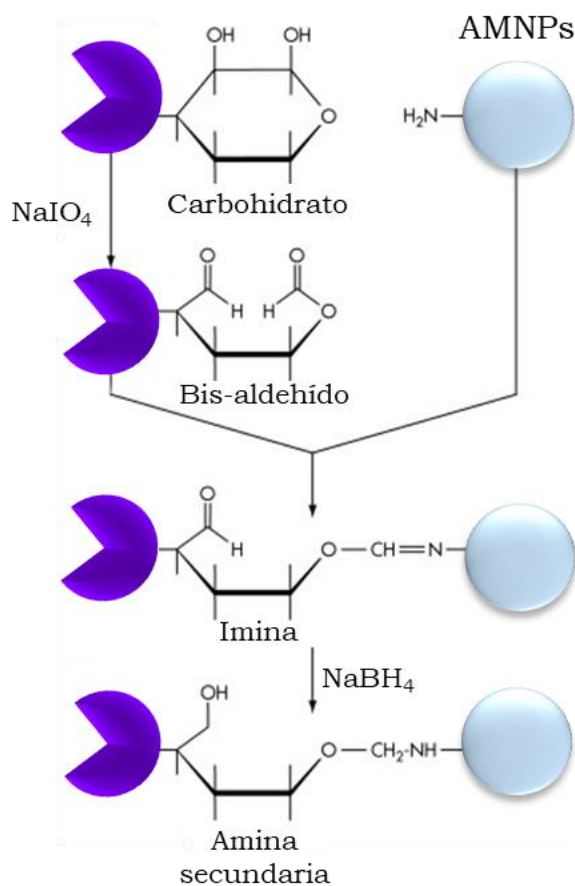


Figura 3.7. Esquema del procedimiento seguido en este trabajo para la inmovilización covalente de glicoproteínas con actividad lipasa a través de sus cadenas glucídicas oxidadas con periodato de sodio. Adaptado de Dent (2020).

La carga proteica óptima determinada en este ensayo se utilizó para inmovilizar OPEr sobre los soportes no magnéticos AG1 y AG4. Las enzimas comerciales se inmovilizaron solo sobre las AMNPs, empleando la misma actividad total que en los ensayos de inmovilización de OPEr. Las proteínas inmovilizadas, a las que denominaremos como AMNP-CH-, AG1-CH- y AG4-CH- seguido del nombre de la respectiva lipasa (Tabla 3.5), se mantuvieron en el mismo tampón a 4 °C hasta su uso.

### **3.9.2.2.Unión covalente a nanopartículas activadas con glutaraldehído mediante grupos amino de la cadena peptídica**

Como en el caso anterior, este procedimiento de inmovilización se aplicó a las lipasas OPEr, Cal A<sup>®</sup>, Cal B<sup>®</sup> y Eversa<sup>®</sup>. De nuevo, se evaluó la relación óptima proteína/soporte solo para OPEr y AMNPs-GA, en reacciones con 1 g de las nanopartículas activadas con glutaraldehído (preparadas según el procedimiento 1 descrito en la sección 3.8.3) y 4, 10 o 14 µg de proteína/mg de soporte en 30 mL de Tris-HCl 100 mM, pH 7. La mezcla se mantuvo en agitación a 80 rpm durante 24 h, a 25 °C. Después de la inmovilización, el sobrenadante fue recuperado para medir la actividad lipasa y la concentración de proteína residuales (sección 3.5). Las preparaciones con la enzima inmovilizada se lavaron varias veces con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7, para retirar las proteínas no unidas y los restos de glutaraldehído.

La carga proteica determinada en este ensayo se utilizó para inmovilizar OPEr sobre los soportes no magnéticos AG1 y AG4. Las enzimas comerciales se inmovilizaron sobre las AMNPs-GA a partir de soluciones que contenían la misma actividad inicial determinada para OPEr a la carga óptima proteica. Las proteínas inmovilizadas, a las que denominaremos como AMNP-GA-, AG1-GA- y AG4-GA-, seguido del nombre de la respectiva lipasa (Tabla 3.5), se mantuvieron en el mismo tampón a 4 °C hasta su uso.



### **3.9.2.3. Inmovilización de OPEr por precipitación y entrecruzamiento en presencia de AMNPs-GA (mCLEAs-OPEr)**

Este procedimiento, descrito por Kim *et al.* (2010), se aplicó únicamente a la inmovilización de lipasa versátil OPEr. En este caso, al tratarse de un soporte muy similar al empleado en el procedimiento anterior, se mantuvo la proporción proteína/soporte previamente determinada, que fue de 10 µg de proteína/mg de soporte. Se mezcló el extracto enzimático con 1 g de AMNPs-GA (obtenido según el procedimiento 2 descrito en la sección 3.8.3), incubando en 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8. Se mantuvo la reacción en agitación a 50 rpm, durante 2 h, a 25 °C, permitiendo una primera interacción de las proteínas con los grupos aldehído del soporte. A continuación, se añadieron 10 mL de sulfato de amonio 4 M para precipitar las proteínas que quedan en solución, y 10 mL de GA 50 mM (17 mM concentración final), como agente entrecruzante, agitando a 250 rpm durante 1 h a 25 °C y luego durante 24 h a 4 °C. Esta preparación, a la que denominaremos mCLEAs-OPEr (Tabla 3.5), se lavó tres veces con el anterior tampón y cuatro veces más con Tris-HCl 20 mM pH 7, manteniéndola en este tampón a 4 °C hasta su uso.



Tabla 3.5. Nomenclatura de los nanobiocatalizadores en función del soporte, la funcionalización y la lipasa inmovilizada.

Soporte	Funcionalización en superficie	Interacción con el soporte	Lipasa	Nomenclatura
<b>MNPs</b>	<b>Inmovilización no covalente (hidrofóbica)</b>			
	Grupos octilo	Regiones hidrofóbicas	OPEr	SiMAG-Octyl-OPEr
	<b>Inmovilización covalente</b>			
	Grupos amino	Aldehídos de cadenas glucídicas	OPEr	AMNP-CH-OPEr
			Cal A®	AMNP-CH-Cal A
			Cal B®	AMNP-CH-Cal B
			Eversa®	AMNP-CH-Eversa
	Grupos aldehído	Precipitación y entrecruzamiento	OPEr	mCLEAs-OPEr
		Grupos amino reactivos	OPEr	AMNP-GA-OPEr
			Cal A®	AMNP-GA-Cal A
			Cal B®	AMNP-GA-Cal B
			Eversa®	AMNP-GA-Eversa
<b>G1</b>	Grupos amino	Aldehídos de cadenas glucídicas	OPEr	AG1-CH-OPEr
	Grupos aldehído	Grupos amino reactivos	OPEr	AG1-GA-OPEr
<b>G4</b>	Grupos amino	Aldehídos de cadenas glucídicas	OPEr	AG4-CH-OPEr
	Grupos aldehído	Grupos amino reactivos	OPEr	AG4-GA-OPEr

### **3.9.3. Seguimiento de la eficiencia de inmovilización. Evaluación de la actividad de los nanobiocatalizadores producidos**

Para el seguimiento de la inmovilización se valoró experimentalmente la actividad lipasa inicial ofrecida ( $A_i$ ), la actividad lipasa residual ( $A_r$ ) tras el proceso y la actividad lipasa inmovilizada (sección 3.5.3). A partir de estos datos, se calcularon dos parámetros principales: el rendimiento de inmovilización y la actividad específica de cada nanobiocatalizador sintetizado.

El rendimiento de inmovilización (% Rdto. Inmov.) se define como:

$$\% \text{ Rdto. Inmov.} = (A_r/A_i) \times 100$$

La actividad específica ( $A_e$ ) del nanobiocatalizador o actividad inmovilizada observada, se expresa en mU por mg de nanobiocatalizador, y se determinó utilizando 250  $\mu\text{g}$  de cada uno de los nanobiocatalizadores sintetizados.

Dos parámetros más fueron calculados para evaluar los procedimientos de inmovilización:

- La eficiencia (%) que se calcula en base a la  $A_e$  y la  $A_r$ :

$$\text{Eficiencia (\%)} = (A_e/A_i - A_r) \times 100$$

- La actividad recuperada (%) de la enzima, que se determina considerando la actividad observada en el inmovilizado ( $A_e$ ) y la actividad lipasa inicial ( $A_i$ ):

$$\text{Actividad recuperada (\%)} = (A_e/A_i) \times 100$$

## **3.10. Caracterización**

### **3.10.1. Espectroscopia de infrarrojos mediante transformada de Fourier (FTIR)**

Tanto los soportes utilizados como los nanobiocatalizadores finales se analizaron por FTIR, fabricando un disco sólido de KBr

que contiene la muestra a analizar. Para ello, se mezcló alrededor de 1 mg de cada muestra con 300 mg de KBr en un mortero de ágata y se dejó secar en una estufa a 65 °C, para eliminar por completo la posible humedad de las muestras. A continuación, las preparaciones se introdujeron en un molde metálico y, utilizando una prensa manual acoplada a una bomba de vacío, se ejerció una presión de 2 toneladas durante 2 min, aumentando la presión hasta 10 toneladas durante 4 min. Los discos formados se analizaron en un espectrofotómetro FTIR Jasco FT/IR-4200 tipo A (Jasco Corporation) en el rango espectral de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . El detector empleado fue triglicina-sulfato, con una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$  en modo de transmitancia.

### **3.10.2. Magnetismo**

Se analizó el comportamiento magnético de las MNPs antes y después de su funcionalización para comprobar si sus propiedades magnéticas se mantenían tras el tratamiento. Las mediciones magnéticas se realizaron en un Magnetómetro Quantum Design XL-SQUID en el CAI de la Universidad Complutense de Madrid, en colaboración con el equipo del Dr. F. López del CENIM-CSIC. Las mediciones de histéresis se tomaron con un rango de campo aplicado de 0 a 50000 Oe (5T).

### **3.10.3. Difracción de rayos X (XRD)**

Estos ensayos se realizaron en colaboración con el equipo del Dr. F. López del CENIM-CSIC. Los patrones de XRD se registraron utilizando un difractómetro Siemens D5000 equipado con un ánodo de Cu (radiación Cu  $K_{\alpha}$ ) y un monocromador de LiF para estudiar la estructura y el análisis de fase. El refinamiento de Rietveld de los patrones XRD fue realizado utilizando el software TOPAS v4.2 (Bruker ASX) teniendo en cuenta la información cristalográfica para las diferentes fases en la base de datos de estructura cristalina de Pearson para compuestos inorgánicos (Villars and Cenzual, 2008). El tamaño medio de cristal de las MNPs desnudas

también se estimó mediante un patrón de rayos X utilizando la fórmula de Debye-Scherrer (Mendelson, 1969):

$$D_{hkl} = 0,89 \cdot \lambda / \beta \cdot \cos \theta$$

donde  $D_{hkl}$  es el tamaño promedio del cristal, 0,89 es el factor de forma (suponiendo partículas esféricas),  $\lambda$  es la longitud de onda de rayos X utilizada (1,5406 Å para Cu  $K_{\alpha}$ ),  $\beta$  es la anchura del pico al 50% de su altura (FWHM) de difracciones experimentales y  $\theta$  es el ángulo de Bragg.

#### **3.10.4. Microscopía electrónica**

El análisis morfológico de los soportes y los nanobiocatalizadores se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un instrumento JEOL JEM 2100, operando a 200 kV y por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) utilizando un microscopio JEOL JSM 7600F operando a 15 kV y equipado con un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X OXFORD INCA.

Para las medidas de TEM, las muestras secas se dispersaron en *n*-butanol mediante ultrasonidos, y unas gotas de las suspensiones correspondientes se depositaron en rejillas de cobre recubiertas de carbono. En estas imágenes se estudió la distribución de tamaño de las nanopartículas y el diámetro medio de partícula. En el caso de las medidas de FE-SEM, las muestras secas se colocaron en un portamuestras metálico sobre una cinta de carbono conductor adhesivo, y se recubrieron con oro durante 50 segundos.

#### **3.11. Microscopía confocal láser de barrido**

Los diferentes soportes y los nanobiocatalizadores sintetizados a partir de ellos en esta Tesis se analizaron mediante microscopía confocal láser de barrido. Aunque de forma indirecta, mediante esta técnica se puede visualizar la incorporación de la lipasa versátil OPEr en la superficie de los

soportes tras la inmovilización. En nuestro caso, la detección se basa en la interacción de la lipasa inmovilizada con el conjugado concanavalina A-Alexa Fluor® 594 (Thermo Fisher Scientific). La concanavalina A es una lectina con capacidad de interaccionar con las cadenas glucídicas de las glicoproteínas secretadas por levaduras, ya que contienen unidades de  $\alpha$ -(1,6) manosa (Bretthauer and Castellino, 1999). Tras la excitación del fluorocromo, con la frecuencia de luz láser adecuada, éste emite a una determinada longitud de onda, dando una imagen registrable en el microscopio. Si las glicoproteínas han quedado inmovilizadas sobre el soporte, la intensidad de la señal fluorescente emitida debe ser netamente superior en los nanobiocatalizadores que en los respectivos soportes sin proteína. Teniendo en cuenta que en los experimentos preliminares con los soportes sin proteína inmovilizada se observó una fuerte intensidad de fluorescencia, poniendo de manifiesto la existencia de sitios de unión inespecíficos para el fluorocromo sobre el soporte, estos sitios se bloquearon con la proteína BSA, antes de añadir la enzima a inmovilizar (Figura 3.8).

El procedimiento seguido para el análisis de las muestras se describe a continuación. En primer lugar, se tomaron 10  $\mu$ L de las suspensiones de cada nanobiocatalizador (a una concentración de 50 mg/mL), sonicándolas para conseguir una suspensión homogénea y pre-incubándolas hasta el día siguiente con una solución de BSA al 10% en PBS (tampón fostato salino), pH 7,4 en presencia de Tween 20 al 0,1%. Después, se eliminó esta solución lavando tres veces con PBS, pH 7,4. Las muestras se incubaron entonces en oscuridad durante 30 min a 4 °C con 0,06  $\mu$ g/mL del conjugado concanavalina A-Alexa Fluor® 594, cuyas longitudes de onda máximas de absorción/emisión son 590/617 nm. Las muestras marcadas se lavaron 3 veces con PBS, pH 7,4 y se resuspendieron en el mismo tampón. Se colocó una gota de la suspensión en un portaobjetos y se observó en el microscopio. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal LEICA TCS SP2 AOBS, con el objetivo de inmersión

(63x). Se utilizó un láser DPSS (láser de estado sólido bombeado por diodos), a 561 nm, detectando la emisión de fluorescencia roja brillante en el rango de 591-670 nm.

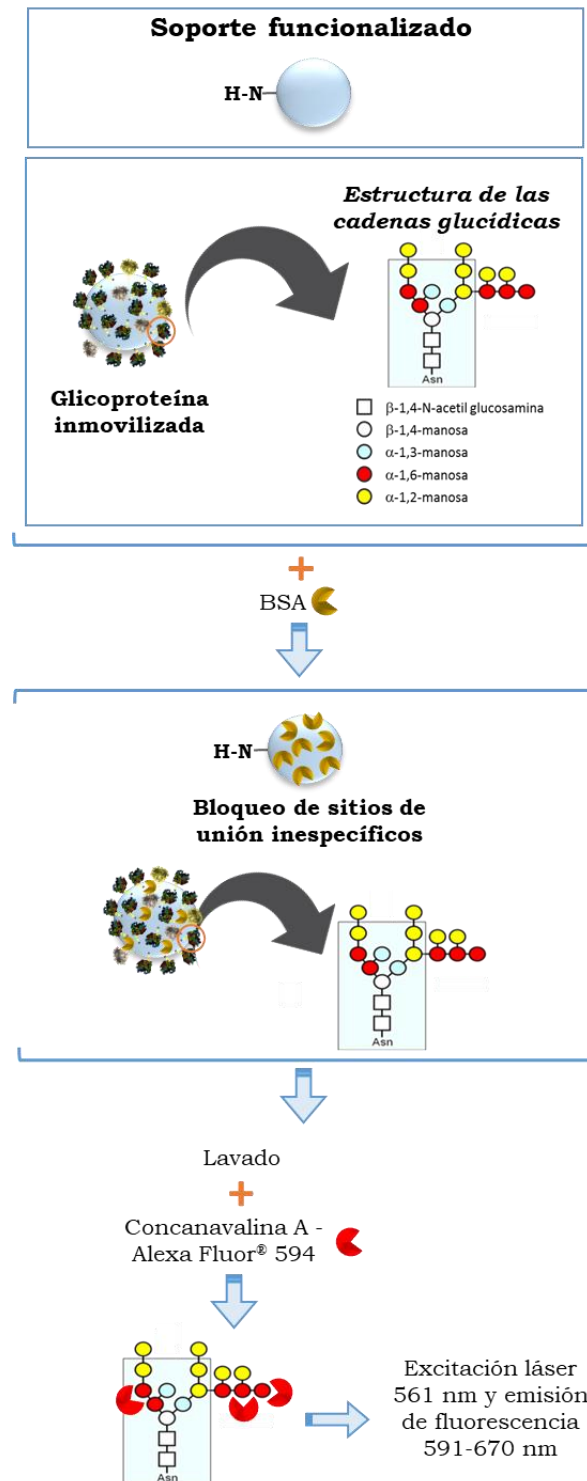


Figura 3.8. Esquema de la preparación de muestras para su observación mediante microscopía confocal.

### 3.12. Estabilidad de los nanobiocatalizadores

#### 3.12.1. Estabilidad a pH y temperatura

Se evaluó la estabilidad térmica de OPEr libre e inmovilizada y de algunos de los biocatalizadores comerciales, disueltos o resuspendidos en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7, en un rango de temperaturas comprendido entre 25 y 70 °C.

La estabilidad a pH se determinó, a 4 °C, en soluciones o suspensiones de los mismos catalizadores en tampón Britton y Robinson, en un rango de valores de pH entre 2 y 10. La composición de este tampón se detalla en la Tabla 3.6. Se preparó y alicuotó una solución stock 0,5 M de tampón, añadiendo NaOH para ajustar el pH al valor deseado.

Tabla 3.6. Composición del tampón Britton y Robinson.

Componente	Cantidades para 1 L
Ácido acético glacial	28,6 mL
Ácido bórico ( $H_3BO_3$ )	30,9 mg
Ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ )	33,7 mL

Para los ensayos con enzimas inmovilizadas se resuspendieron 250 µg del nanobiocatalizador en 500 µL de tampón. En todos los casos, se agitó durante 24 h, a 1.200 rpm, en un termobloque a cada una de las temperaturas y pH probados. Finalmente, se midió la actividad residual frente a pNPB (sección 3.5.3), asignando arbitrariamente como el 100% de actividad al valor obtenido a 25 °C, en las valoraciones de termoestabilidad, y a pH 7 para las de estabilidad a pH. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.12.2. Estabilidad de almacenamiento**

La estabilidad de los catalizadores inmovilizados durante un período prolongado de almacenamiento es una característica importante para su potencial aplicación. Por ello, evaluamos su actividad tras su almacenamiento, durante un máximo de ocho meses, a 4 °C en Tris-HCl 20 mM, pH 7, sin adición de estabilizantes. La actividad residual fue medida frente a *p*NPB, utilizando 250 µg de cada uno de los nanobiocatalizadores.

### **3.12.3. Estabilidad operacional**

Para estudiar la reciclabilidad de los nanobiocatalizadores en las distintas aplicaciones biotecnológicas evaluadas en este trabajo (sección 3.13), se llevaron a cabo varios ciclos catalíticos bajo las mismas condiciones de reacción. Tras cada uno de los ciclos, se separó el nanobiocatalizador de la mezcla de reacción utilizando un imán de neodimio para los magnéticos y mediante centrifugación para los no magnéticos. Después se lavó con 1 mL de isooctano y 1 mL de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7, y se reutilizó en un nuevo ciclo.

## **3.13. Aplicaciones biotecnológicas**

A continuación, se describen los métodos empleados para evaluar el potencial de los nanobiocatalizadores en reacciones de esterificación y transesterificación de interés biotecnológico. En todos los casos, se compararon los resultados obtenidos de los catalizadores inmovilizados con los obtenidos para la enzima libre. En cada una de las aplicaciones, se indicará cuáles fueron las preparaciones evaluadas. La manipulación de los nanobiocatalizadores para la retirada de tampones, solventes y reactivos, y para su recuperación y reciclado, se realizó de la forma descrita en el apartado anterior (3.12.3).

En el Anexo I se adjunta una tabla que resume las aplicaciones ensayadas y todas las enzimas inmovilizadas



empleadas para cada una de ellas, organizadas según el tipo de soporte.

### 3.13.1. Esterificación de ácidos grasos de cadena corta: aromas

Se estudió el potencial de los nanobiocatalizadores para llevar a cabo reacciones de esterificación de ácidos grasos volátiles de entre 4 y 7 átomos de C con 1-butanol (Figura 3.9), para la producción de aromas y saborizantes. Todos los nanobiocatalizadores sintetizados con las enzimas OPEr, Cal A<sup>®</sup> y Cal B<sup>®</sup> fueron evaluados mediante el ensayo que se describe a continuación. Se depositaron 11 U del biocatalizador libre o inmovilizado en un tubo Eppendorf de 2 mL. En las reacciones catalizadas por enzimas libres (solubles), la fase acuosa representaba el 10% del volumen final de la reacción.

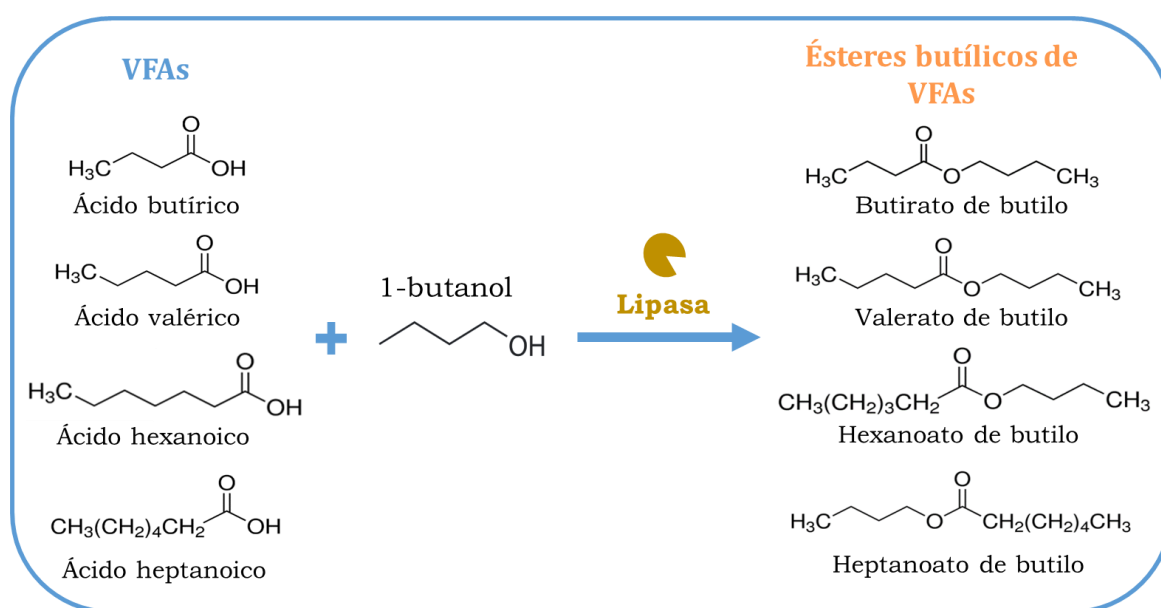


Figura 3.9. Esquema de las reacciones y condiciones de esterificación directa de ácidos grasos de cadena corta (C4-C7) con 1-butanol.

A continuación, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción preparada en viales independientes, que contenía los sustratos, disueltos en isooctano, a una concentración final de ácido graso 100 mM (ácidos grasos volátiles de cadena lineal C4-C7) y 200

mM de 1-butanol (relación molar 1:2 ácido:alcohol), y 2% de hexano como patrón interno para cuantificar los sustratos y los productos por cromatografía de gases (GC).

Los experimentos estándar se realizaron, por tanto, con 11 U de actividad y una proporción molar de los sustratos 1:2, con mezclado rotacional a 100 rpm (Multi Bio RS-24, Biosan) y 25 °C, durante 8 h. Para evaluar la influencia de ciertos parámetros en los rendimientos de esterificación y la velocidad de reacción, se seleccionaron algunos nanobiocatalizadores con OPEr, que se detallarán al describir los resultados. Los parámetros elegidos se modificaron individualmente:

➤ Para probar el efecto de la relación molar de los sustratos, se analizaron las proporciones ácido:alcohol 1:1 y 1:3, con 100 mM de ácido.

➤ La influencia de la concentración de cada ácido se analizó en un rango de 100 a 1000 mM para la proporción molar ácido:alcohol 1:2.

➤ La esterificación de dos ácidos grasos volátiles de cadena ramificada, el ácido isobutírico y el ácido isovalérico, también se evaluó en las condiciones estándar para todos los nanobiocatalizadores de OPEr.

Los experimentos se realizaron por duplicado, tomando muestras de 25 µL a las 0, 2, 4, 6 y 8 h para seguir el curso de la reacción por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS), como se describe en la sección 3.14.2.

### **3.13.2. Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga: biodiesel**

Se evaluó la capacidad de todos los nanobiocatalizadores producidos en esta Tesis para catalizar, en ausencia de cosolvente, la metanolisis de aceite de oliva doméstico usado. La Figura 3.10 muestra un esquema general de los sustratos implicados en este tipo de reacciones y de los principales productos esperados.

La mezcla de reacción contenía 500  $\mu\text{L}$  de aceite de oliva reciclado, metanol (proporción molar 1:4, aceite:metanol), colest-4-en-3-ona (Sigma-Aldrich) como patrón interno y 100 mg del catalizador inmovilizado correspondiente. Las reacciones se llevaron a cabo a 25  $^{\circ}\text{C}$ , durante un tiempo máximo de 24 h, mezclando con agitación rotacional a 100 rpm. El metanol fue añadido en tres pasos sucesivos (a las 0 h, 5 h y 9 h). El curso de la reacción se controló determinando la producción de ésteres metílicos, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres y el consumo de triglicéridos, tomando muestras de 15  $\mu\text{L}$  a las 0, 5, 9 y 24 h. Estas muestras fueron diluidas en isooctano para su análisis mediante cromatografía de gases (GC) en las condiciones recogidas en la sección 3.14.3. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado.

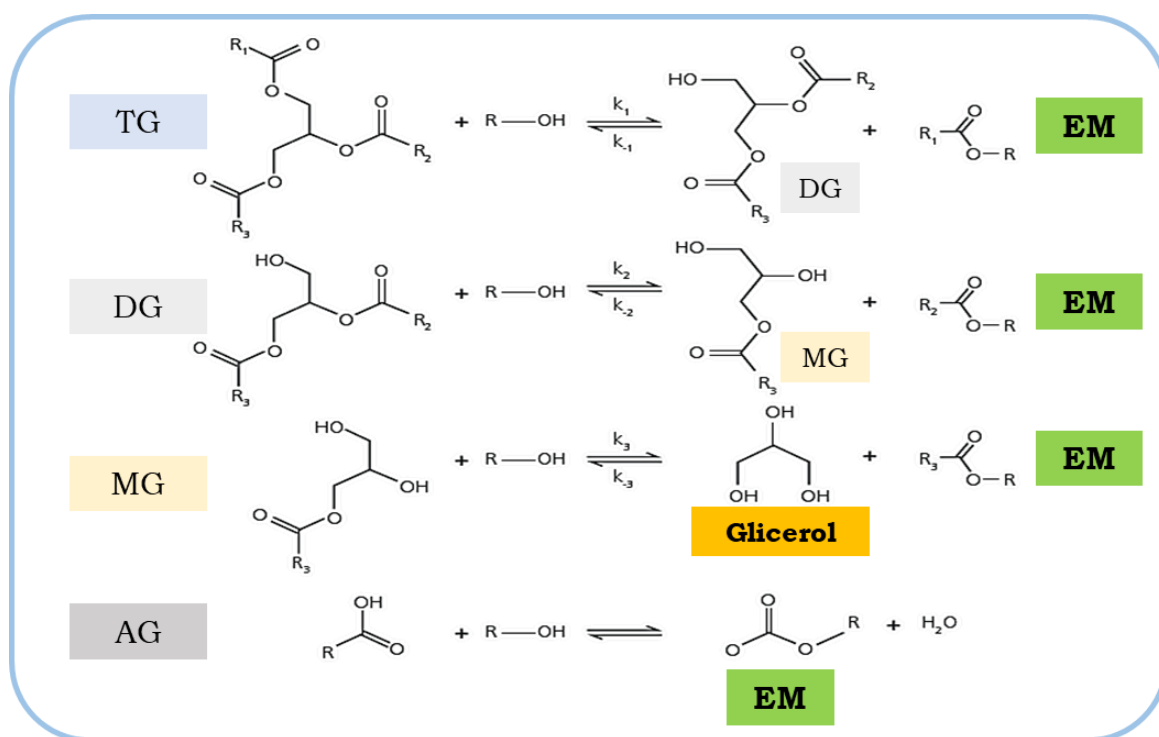


Figura 3.10. Esquema de reacción de alcoholisis de triglicéridos. TG: triglicérido; DG: diglicérido; MG: monoglicérido; AG: ácido graso; EM: éster metílico. Para una alcoholisis completa, la proporción molar alcohol:triglicérido debe ser, como mínimo, de 3:1.

Para evaluar la escalabilidad de esta aplicación, se realizaron reacciones de metanolisis con 5 g del catalizador AMNP-CH-OPeR en un volumen final de reacción de 25 mL bajo las mismas condiciones.

### 3.13.3. Síntesis de ésteres de estanoles: nutraceuticos

#### 3.13.3.1. Esterificación directa y transesterificación de $\beta$ -sitoestanol catalizada por lipasas solubles

Los ensayos iniciales para la puesta a punto de esta aplicación se realizaron utilizando las lipasas versátiles OPE, OPeR, y la lipasa comercial de *C. rugosa* como biocatalizadores. Se abordó la síntesis mediante dos procedimientos: esterificación directa y transesterificación. La Figura 3.11 muestra un esquema de ambas reacciones de síntesis.

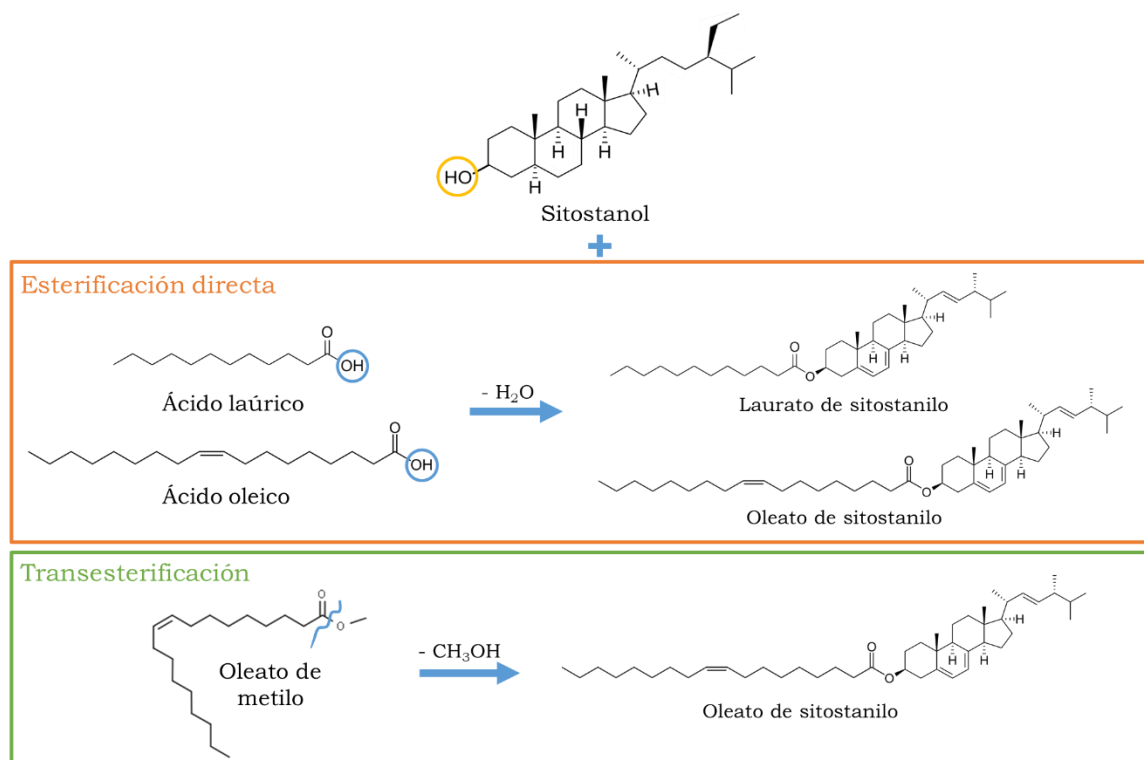


Figura 3.11. Esquema de las reacciones de esterificación directa y transesterificación realizadas en este trabajo.

En primer lugar, se evaluó la funcionalidad de estas lipasas solubles en la esterificación directa de  $\beta$ -sitoestanol (Sigma-Aldrich) con dos ácidos grasos de distinta longitud de cadena y grado de insaturación: ácido láurico (C12) y ácido oleico (C18:1). Las reacciones se desarrollaron en un sistema bifásico isooctano/agua. El  $\beta$ -sitoestanol, aceptor de la reacción, se pesó directamente en los viales y luego se añadieron 400  $\mu$ L la fase orgánica que contenía el donador de acilo disuelto en isooctano. La concentración final de los sustratos en la mezcla de reacción fue 10 mM. La mezcla se calentó a 65 °C durante 5 minutos para solubilizar el estanol y conseguir una solución homogénea antes de añadir la enzima en la fase acuosa (100  $\mu$ L de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7). En el caso de CRL, que viene formulada en polvo, se disolvió el preparado comercial a una concentración de 1 mg/mL en el mismo tampón. Se probó el efecto de la presencia de excesos molares 1:3 y 1:6 de cada uno de los donadores de acilo en las mismas condiciones experimentales.

En paralelo, se sintetizó el éster oleico del  $\beta$ -sitoestanol mediante transesterificación, utilizando oleato de metilo (99%, Sigma Aldrich) como donador de acilos, y se evaluó el efecto de la estequiometría de los sustratos utilizando mezclas aceptor:donador (1:1, 1:3 y 1:6) en isooctano. Las condiciones de reacción fueron las mismas detalladas para la esterificación directa.

Por otra parte, y una vez comprobada la buena solubilidad del  $\beta$ -sitoestanol en oleato de metilo, se ensayó la transesterificación eliminando el cosolvente de la mezcla de reacción. En estas condiciones, el oleato de metilo tiene una función dual, ya que actúa como disolvente y como donador de acilos. Se prepararon soluciones entre 10-80 mM de  $\beta$ -sitoestanol en oleato de metilo, calentando a 65 °C hasta su total disolución. A continuación, se añadieron 400  $\mu$ L de esta mezcla de sustratos a los viales que contenía el catalizador disuelto en 100  $\mu$ L del tampón.

Todas las reacciones contenían una dosis de biocatalizador de 3 U/mL (medida frente a *p*NPB) y se mantuvieron en agitación a

1.200 rpm en un agitador magnético a 28 °C por un período máximo de 120 h.

Para el seguimiento de las reacciones, se añadió colest-4-en-3-ona al medio de reacción como patrón interno junto con los sustratos. Se recogieron muestras de 15  $\mu$ L de la fase orgánica a distintos tiempos y se diluyeron en isooctano, para su análisis por GC como se describe en la sección 3.14.4.

### **3.13.3.2. Transesterificación de $\beta$ -sitoestanol catalizada por los nanobiocatalizadores con OPEr inmovilizada**

Una vez puestas a punto las condiciones para la síntesis enzimática de ésteres por transesterificación de  $\beta$ -sitoestanol y oleato de metilo, se estudió la eficiencia y reciclabilidad de los ocho nanobiocatalizadores sintetizados con OPEr: SiMAG-Octyl-OPEr, AMNPs-GA-OPEr, mCLEAs-OPEr, AMNP-CH-OPEr, AG1-GA-OPEr, AG1-CH-OPEr, AG4-GA-OPEr y AG4-CH-OPEr.

Para la realización de estos ensayos de transesterificación se preparó una solución 80 mM de  $\beta$ -sitoestanol en oleato de metilo comercial. A esta mezcla de reacción se añadió colest-4-en-3-ona como patrón interno para la cuantificación por GC, un 20% de agua y 70 U/mL de OPEr libre o inmovilizada, siendo el volumen final de 500  $\mu$ L. Las reacciones se llevaron a cabo en un máximo de 15 h, a 25 °C y 100 rpm con mezcla rotacional. Los experimentos se realizaron por duplicado, tomando muestras de 15  $\mu$ L a las 0, 2 y 15 h para seguir el curso de la reacción por GC (sección 3.14.4).

### **3.13.3.3. Reacciones en cascada para la síntesis secuencial de donadores de acilo y ésteres de estanol catalizada por AMNP-CH-OPEr**

En este enfoque, en lugar de utilizar como sustrato un éster metílico comercial, el donador de acilo se sintetizó enzimáticamente a partir de aceite de oliva usado, con AMNP-CH-OPEr como catalizador. Para ello:

1. Se realizaron reacciones de transesterificación con 500  $\mu\text{L}$  de aceite de oliva usado, metanol y 70 U de AMNP-CH-OPeR (100 mg), según el procedimiento descrito en la sección 3.13.2 (relación molar 1:4, 25 °C, 100 rpm, 24 h). La composición de la mezcla al tiempo final de reacción se analizó mediante GC/MS (ver sección 3.14.3).

2. Esta mezcla de reacción se utilizó a continuación, como sustrato donador y único solvente, para la síntesis de ésteres de estanol, utilizando el mismo nanobiocatalizador, AMNP-CH-OPeR y las condiciones de reacción descritas en el apartado 3.13.3.2. La mezcla de reacción final, que contenía los ésteres de estanol, se analizó por GC, como se explica en la sección 3.14.4.

### **3.14. Métodos de análisis utilizados para el seguimiento de las reacciones. Identificación y cuantificación de sustratos y productos**

La mayor parte de los métodos empleados se basan en el uso de técnicas cromatográficas, principalmente GC, sola o acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Sin embargo, para algunos análisis rápidos en experimentos preliminares, en varias de las aplicaciones las muestras se analizaron mediante cromatografía en capa fina.

#### **3.14.1. Cromatografía en capa fina (TLC)**

Se realizaron análisis por TLC de las muestras de la síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos, siguiendo de forma semicuantitativa la producción de ésteres y el consumo de triglicéridos como un paso de cribado previo al análisis por GC. En primer lugar, se activaron las placas de Silica gel 60 (Polygram Sil G/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel) durante 30 min, a 100 °C. A continuación, se aplicó 0,5  $\mu\text{L}$  de las muestras diluidas (ver sección 3.13.2) a unos 5 cm del borde la placa cromatográfica. Se depositaron unos mililitros de la fase móvil, *n*-hexano:acetato de etilo:ácido acético (90:10:1), en un recipiente y se introdujo la placa con las muestras cargadas, cerrando el recipiente



herméticamente y dejando que la fase móvil ascienda por capilaridad durante 45 min. Terminada la cromatografía, se secó la placa, y se tiñó por inmersión en una solución de Coomassie Blue R-250 al 0,02% (p/v) en ácido acético:metanol:agua (10:30:60), durante 1 min en agitación. Después se retiró el exceso de solución y se dejó secar. Las manchas de los componentes de la mezcla de reacción se identificaron por comparación de su migración con la de patrones comerciales analizados en idénticas condiciones.

### **3.14.2. Reacciones de síntesis de ésteres de ácidos grasos de cadena corta**

Las alícuotas recogidas de la mezcla de reacción (sección 3.13.1), se depositaron en un vial y se mezclaron con 25  $\mu$ L de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA, Sigma-Aldrich), para derivatizar las muestras, a 60 °C, durante 10 min. Se inyectó 1  $\mu$ L de esta solución en un equipo GC/MS (Agilent Technologies) compuesto por un cromatógrafo de gases 7890A acoplado a un detector de masas cuadrupolar 5975C. El inyector se programó a 275 °C y se utilizó He (13 psi) como gas portador. La separación se llevó a cabo utilizando una columna capilar de sílice fundida DB 5-HT (30 m x 250  $\mu$ m x 0,1  $\mu$ m, Agilent Technologies). Para el análisis de los ésteres de ácidos grasos volátiles, el horno se mantuvo a 80 °C, durante 1 min, y luego se aplicó un programa de temperatura, con una velocidad de rampa de 70 °C/min para alcanzar una temperatura final de 240 °C. La adquisición y análisis de datos se realizó utilizando el programa MSD ChemStation E.02.00.493 (Agilent Technologies) asociado al instrumento.

Para identificar y cuantificar los componentes de la reacción, se prepararon y analizaron estándares comerciales en condiciones idénticas a las muestras. Sustratos y productos se identificaron a partir de su tiempo de retención y espectro de masas, en comparación con los de los patrones. Los rendimientos de esterificación se calcularon a partir de rectas de



calibración que representaban los factores de respuesta de los compuestos analizados respecto del patrón interno.

### **3.14.3. Reacciones de síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga**

Se utilizó como sustrato aceite de cocina doméstico usado, y las muestras de la reacción a tiempo final se analizaron por GC/MS, para determinar su composición, con el mismo instrumento y columna detallados en el apartado anterior. En este caso se aplicó un programa de temperatura de varios pasos: una rampa con una velocidad de 3 °C/min desde 180 °C a 205 °C, a continuación, 10 °C/min hasta 220 °C que se mantiene durante 5 min y, por último, de 220 °C a 400 °C, manteniendo la temperatura final durante 5 min. Los compuestos detectados se identificaron comparando sus tiempos de retención y espectros de masas con los de estándares comerciales, analizados en condiciones idénticas a las de las muestras, o a través de sus espectros de masas utilizando la base de datos NIST 2011 y el software ChemStation (Agilent Technologies).

Por otro lado, el curso de las reacciones fue analizado mediante la inyección de 1 µL de las muestras diluidas en isooctano (sección 3.14.1) en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies). El inyector y el detector de ionización de llama se mantuvieron a 350 °C y se utilizó He (20 psi) como gas portador. La separación se llevó a cabo utilizando una columna capilar de sílice fundida SPB-1 (5 m x 250 µm x 0,25 µm, Supelco). Se usó un programa de temperatura con 140 °C de temperatura inicial (mantenida durante 1 minuto), una primera rampa de 10 °C/min hasta 170 °C, y una segunda hasta 350 °C, manteniendo la temperatura final durante 5 min.

### **3.14.4. Análisis de muestras de las reacciones de síntesis de ésteres de estanoles**

Las reacciones de síntesis de ésteres de sitoestanol se analizaron por GC, inyectando 1 µL de las muestras diluidas en isooctano (sección 3.14.2) y empleando el mismo equipo y

columna descritos en la sección anterior. El horno se mantuvo a 115 °C durante 1 min y luego se aplicó un programa de temperatura de varios pasos, con una velocidad de rampa de 10 °C/min, hasta 170 °C, y una segunda rampa de 20 °C/min, hasta alcanzar una temperatura final de 350 °C, que se mantuvo durante 4 min. Los picos de los sustratos,  $\beta$ -sitoestanol, oleato de metilo, ácido láurico y ácido oleico, se identificaron por sus tiempos de retención, comparándolos con los de estándares comerciales preparados y analizados en condiciones idénticas a las muestras. Para el análisis cuantitativo, se obtuvo una recta de calibrado analizando diferentes concentraciones  $\beta$ -sitoestanol junto con el patrón interno. Los rendimientos de esterificación se calcularon indirectamente a partir de la cantidad de  $\beta$ -sitoestanol residual, debido a la falta de estándares comerciales para estos ésteres.

Se confirmó la presencia del éster en el medio de reacción por FTIR. Las muestras se prepararon y analizaron de forma similar a lo descrito en la sección 3.11.1, depositando 2  $\mu$ L de la mezcla de reacción sobre 300 mg de KBr pulverizado y dejando secar antes de aplicar presión. Los espectros se registraron en el rango infrarrojo medio, entre 700-4.000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.15. Análisis de citotoxicidad de los nanobiocatalizadores**

Para evaluar la posible migración de compuestos tóxicos de los nanobiocatalizadores con OPEr a los sobrenadantes de las reacciones de transesterificación, se prepararon suspensiones a concentraciones superiores a las utilizadas en los experimentos: 1.250 mg/mL, en el caso de las inmovilizaciones con glutaraldehído (-GA-), y 700 mg/mL de todos los restantes, en PBS estéril pH 7,4, y se mantuvieron en agitación, durante 24 h a 25 °C. Los sobrenadantes se recuperaron y filtraron a través de un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore) y se añadieron a cultivos de las líneas celulares HeLa y A549 para evaluar su posible citotoxicidad. Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Isabel

Barasoáin y con Carmen Doñoro, del Servicio de Cultivos Celulares del CIB-CSIC.

Las células HeLa (células humanas de carcinoma de cuello uterino) se mantuvieron en DMEM (medio *Dulbecco modified Eagles minimal essential*, referencia 41966-029, Gibco, Life Technologies) enriquecido con glucosa y piruvato. Las células A549 (células humanas tumorales del epitelio alveolar basal) se cultivaron en RPMI-1640 (medio *Roswell Park Memorial Institute*, referencia 21875-034, Gibco) con L-glutamina. Ambos medios fueron complementados con un 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich), 10 U/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco) y se incubaron a 37 °C en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de 120.000 células/mL para la línea celular HeLa y 160.000 células/mL para las células A549. Se añadieron 80 µL por pocillo y se cultivaron en 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, durante 24 h. Al día siguiente, se prepararon diluciones seriadas ( $\frac{1}{2}$ ) a partir de las soluciones iniciales de los sobrenadantes de cada nanobiocatalizador, y se añadieron 20 µL por pocillo. Las concentraciones máximas finales a las que se expusieron las células correspondían a los sobrenadantes de suspensiones de los nanobiocatalizadores con 250 mg/mL (para catalizadores -GA-) o 140 mg/mL.

Después de 48 h de incubación, se realizó un ensayo utilizando MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich) para determinar la viabilidad celular según el protocolo de Mosmann (1983), con algunas modificaciones. El MTT es captado por las células y reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa formando cristales de formazán que son insolubles. La capacidad de las células para reducir el MTT, constituye un indicador de la integridad mitocondrial y es interpretada como una medida de viabilidad celular.

En cada pocillo, se agregaron 20 µL de una solución 2,5 mg/mL de MTT, incubando durante 4 h, a 37 °C. Para solubilizar

los cristales de formazán que se forman en esta reacción, se añadieron 0,1 mL de una solución que contenía un 10% de SDS y 45% de dimetilformamida pH 5,5 y se incubó durante toda la noche, a 37 °C. Tras este tratamiento, el líquido de la reacción adquiere un color azul, cuya absorbancia puede cuantificarse mediante espectrofotometría, midiendo la relación de absorbancia 595/690 nm en un lector automático de microplacas multiescáner. Se utilizaron como blanco pocillos que contenían medio sin células.

El análisis de los datos se procesó con el programa SigmaPlot 13.0 representando el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la relación de absorbancias. Los resultados se expresaron como la dosis que inhibe el crecimiento del 50% de las células después del período de incubación (IC<sub>50</sub>). El estándar incluido como control positivo fue la colchicina, a concentraciones entre 800 nM-1,5 µM.

Para la observación microscópica de las células, se utilizó un microscopio invertido con contraste de fase Zeiss IM, y las micrografías se obtuvieron utilizando una cámara digital AxioCam ERc5s.

## ***4. Resultados y discusión***



#### 4.1.Lipasas

En este trabajo se han utilizado distintas preparaciones de lipasas solubles, cuyas principales características, recogidas de datos de la literatura, se detallan en la Tabla 1.2. Todas ellas corresponden a extractos de enzimas fúngicas, y las lipasas que contienen se han inmovilizado sin previa purificación, con el objetivo de reducir al mínimo los costes del proceso global.

La lipasa versátil de *O. piceae* y su forma recombinante obtenida en *P. pastoris* se produjeron en medio líquido en nuestro laboratorio. La producción máxima de la enzima nativa (1,4 U/mL) se alcanzó a los 14 días de cultivo en un medio que contenía aceite de oliva como inductor. La recombinante se produjo en medio YEPS, induciendo la expresión del gen diariamente con metanol, y los niveles máximos de actividad extracelular (20 U/mL) se detectaron tras 4 días de incubación. Tras estos períodos, se eliminaron las células por centrifugación y filtración, sometiendo los sobrenadantes a ultrafiltración para obtener los extractos enzimáticos crudos concentrados con los que se trabajó. Estos resultados muestran que la producción de la enzima recombinante es mucho más eficiente que la de la nativa tanto por los niveles de actividad como por el tiempo de incubación.

La selección de las enzimas comerciales se realizó atendiendo a varias razones. Los estudios iniciales de este trabajo se enfocaban en la síntesis enzimática de ésteres de fitoesteres catalizada por la enzima soluble de *O. piceae*. Para comparar su actividad con la de otras lipasas fúngicas se eligieron, además de la enzima recombinante OPEr, la preparación comercial de lipasa de *C. rugosa* (Kontkanen *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2011; Villeneuve *et al.*, 2005) y las lipasas recombinantes, comercializadas por Novozymes, Cal A® y Cal B® de *C. antarctica*, descritas como biocatalizadores para múltiples aplicaciones de interés, incluyendo la síntesis de ésteres de esteroides (Panpipat *et al.*, 2013). Además, las propiedades bioquímicas y catalíticas de estas dos últimas enzimas son bien conocidas, y se

consideran biocatalizadores únicos por la amplia variedad de sustratos sobre los que actúan (Kirk and Christensen, 2002). Cal B® es una de las lipasas más estables, y la más utilizada a escala industrial en procesos de síntesis orgánica (Ortiz *et al.*, 2019), y Cal A® se caracteriza por su eficacia frente a sustratos muy voluminosos o con grupos alcohólicos poco accesibles (Kirk and Christensen, 2002), razones por las cuales también han sido ensayadas en otras aplicaciones abordadas en esta tesis. Finalmente, también se utilizó Eversa®, otro preparado de Novozymes, que contiene una forma modificada de la lipasa de *T. lanuginosus*, y cataliza la síntesis de biodiesel con alta eficiencia (Adewale *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2017; Remonatto *et al.*, 2018). Este producto fue lanzado al mercado en 2014 y se publicitó como la primera solución enzimática para la síntesis de biodiesel a partir de aceites usados (Novozymes, 2014).

En primer lugar, analizaremos los resultados derivados de la caracterización de los extractos enzimáticos utilizados, en los que determinamos su actividad y contenido proteico. Puesto que los ensayos inicialmente planteados en este trabajo iban dirigidos hacia la síntesis enzimática de ésteres de fitoestanoles y de ácidos grasos de cadena corta, la actividad de cada una de las preparaciones solubles se midió valorando la hidrólisis de *p*NPB. El uso de este sustrato modelo para valorar las actividades lipasa y esterasa está ampliamente documentado (Fernandez-Lopez *et al.*, 2017; Otero *et al.*, 2005; Viñambres *et al.*, 2018; Zaak *et al.*, 2017) ya que el *p*NP liberado en la hidrólisis se detecta fácilmente por colorimetría. Sin embargo, conviene tener en cuenta que, al ser un éster de un ácido graso de cadena corta, es más adecuado para medir actividad esterasa.

La Tabla 4.1 recoge los resultados de estas determinaciones, ilustrando la disparidad de valores registrados para el contenido proteico y la actividad frente a *p*NPB de los seis extractos enzimáticos analizados. Esta disparidad se debe, por una parte, a la diferente especificidad de sustrato de cada una de las lipasas. El contenido en proteínas también es variable y, además,



no toda la proteína detectada es lipasa, ya que se están analizando los extractos crudos.

Tabla 4.1. Actividad lipasa frente a *p*NPB y concentración de proteína de los extractos con actividad lipasa empleados en este trabajo.

<b>Lipasa</b>	<b>Actividad (U/mL)</b>	<b>Concentración proteica (mg/mL)</b>
<b>OPE</b>	41 ± 4	1,2 ± 0
<b>OPEr</b>	378 ± 75	25,0 ± 3,4
<b>CRL</b>	19 ± 2	2,3 ± 1,6
<b>Cal A<sup>®</sup></b>	287 ± 37	60,6 ± 1,7
<b>Cal B<sup>®</sup></b>	51 ± 9	102,1 ± 0,1
<b>Eversa<sup>®</sup></b>	974 ± 63	73,1 ± 0,1

## 4.2. Soportes

Los materiales empleados como soportes para la inmovilización pueden ser orgánicos, inorgánicos o híbridos (Zdarta *et al.*, 2018). En general, se prefieren los nanomateriales inorgánicos por factores como su gran área superficial, la presencia de grupos funcionales superficiales que se pueden modificar químicamente permitiendo la fijación de la proteína mediante distintos procedimientos, su insolubilidad en agua, elevada estabilidad y resistencia microbiológica, buenas propiedades de adsorción y bajo coste (Zdarta *et al.*, 2018; Zucca and Sanjust, 2014). En los últimos años, se ha popularizado el uso de distintos tipos de nanomateriales para la inmovilización de enzimas. Entre sus ventajas, cabe destacar que suelen ser no porosos, de modo que la enzima se localiza en su superficie, minimizando o anulando los problemas de difusión interna de los sustratos, y entre sus desventajas, la dificultad para separarlos del medio de reacción por su pequeño tamaño (Cipolatti *et al.*, 2016). En esta Tesis se han empleado dos tipos de soportes inorgánicos. Como primera opción, se eligió trabajar

con nanopartículas de magnetita, que son especialmente atractivas por permitir una fácil separación y recuperación del soporte mediante la aplicación de un campo magnético externo (Cao *et al.*, 2012; Cipolatti *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Muley *et al.*, 2020; Netto *et al.*, 2013). La magnetita es el óxido de hierro más utilizado para inmovilización enzimática debido a sus ventajas aunque, debido a la tendencia a la agregación de las nanopartículas y a su fácil oxidación en el aire, es preciso modificar su superficie para evitar su pérdida de magnetismo y de dispersabilidad (Bilal *et al.*, 2018). De hecho, los soportes basados en magnetita la incorporan en el interior de nanopartículas recubiertas por un material protector, generalmente silíceo. En segundo lugar, hemos ensayado la posibilidad de utilizar como soporte un nuevo tipo de material no magnético sintetizado en laboratorio del Dr. Félix López (grupo TecnoEco, CENIM-CSIC) a partir del tratamiento hidrometalúrgico de baterías agotadas (“masa negra”). Químicamente, estos compuestos son óxidos metálicos binarios con diferentes proporciones de Zn/Mn, con fórmula general  $Zn_xMn_{3-x}O_4$  ( $0,25 \leq x \leq 1,25$ ), que se sintetizan a través de una etapa de lixiviación ácida del Zn y Mn, seguida de la precipitación de los cationes  $Zn^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  en un medio alcalino. Este tipo de óxidos puede ser un material interesante para su uso como soportes, ya que su síntesis es barata y contribuye a la valorización y reciclado de residuos y productos post-consumo. En nuestro caso, se seleccionaron materiales con dos estequiometrías Zn/Mn diferentes, a los que hemos denominado G1 y G4.

Se utilizaron varias técnicas físicas para caracterizar los soportes elegidos. La difracción de rayos X y la microscopía electrónica se aplicaron al estudio de todas las nanopartículas desnudas (MNPs, G1 y G4), antes de su modificación química. Antes y después de su funcionalización, se analizaron por espectroscopia de infrarrojos. Además, en el caso de las MNPs, se analizaron sus propiedades magnéticas. Estos resultados se

presentan en dos secciones, diferenciando entre soportes magnéticos y no magnéticos, para su mejor comprensión.

#### 4.2.1. Caracterización de los soportes magnéticos

##### 4.2.1.1. Análisis mediante difracción de rayos X (XRD)

Los patrones de XRD de las MNPs (Figura 4.1) mostraron seis máximos de difracción que se pueden asignar a una simetría cúbica con el grupo espacial  $Fd\bar{3}m$  (base de datos JCPDS número 82-1533), lo cual es compatible con una estructura tipo espinela característica de la magnetita. La estimación del tamaño medio de la muestra se realizó utilizando la fórmula de Scherrer (Alcaraz *et al.*, 2015):  $\theta_{hkl} = 0,89\lambda/\beta\cos\theta$ , donde  $\theta_{hkl}$  es el tamaño medio calculado del cristal, 0,89 es el factor de forma (suponiendo partículas esféricas, típica de las fases  $Fe_3O_4$ ),  $\theta$  es el ángulo de Bragg,  $\beta$  es el ancho completo de la media de los máximos de difracción experimentales y  $\lambda$  la longitud de onda de los rayos X. El tamaño medio de las MNPs desnudas se estimó en 15 nm. Además, para realizar una mejor caracterización estructural, se analizó el patrón de XRD por el método de Rietveld. Los resultados obtenidos parecen indicar que la muestra contiene tanto magnetita ( $Fe_3O_4$ ) como otro óxido de hierro, la maghemita ( $Fe_2O_3$ ), aunque el análisis XRD de los óxidos de hierro y la interpretación de los resultados no siempre es lo suficientemente precisa (Wu *et al.*, 2015).

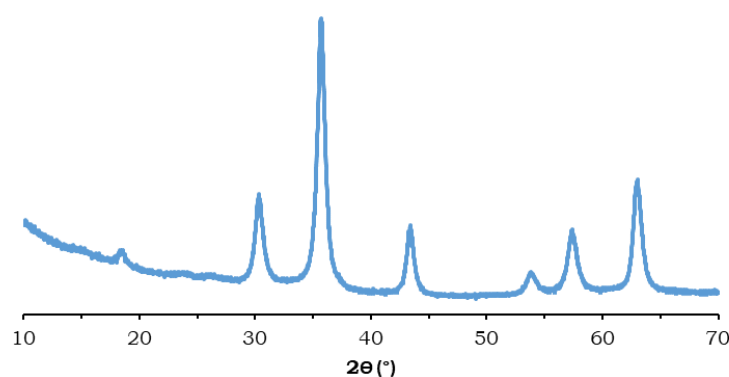


Figura 4.1. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de magnetita comercial desnuda utilizadas en este trabajo.

#### **4.2.1.2. Visualización mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido de los soportes magnéticos**

Las nanopartículas magnéticas tienen una morfología homogénea y esférica (Figura 4.2 a), que corresponde a las fases de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Patil *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2018). La distribución de tamaño de las MNPs indica un diámetro medio de partícula de  $10 \pm 2$  nm (Figura 4.2 a, centro), coherente con el determinado mediante XRD, y el del soporte comercial SiMAG-Octyl es similar (Figura 4.2 b, centro). Sin embargo, en las imágenes de TEM y SEM de estas últimas se observó un material orgánico libre de unos 3 nm de grosor (Figura 4.2 b) cuya naturaleza es desconocida. Según indican las especificaciones del fabricante, las partículas SiMAG-Octyl tienen un diámetro hidrodinámico de 1  $\mu\text{m}$  y contienen un núcleo de magnetita cubierto por una capa de sílice no porosa. Por tanto, de los datos adquiridos se deduce que, aun siendo el tamaño del núcleo magnético de las SiMAG-Octyl® similar al de las MNPs, la existencia de dicho material orgánico debe ser responsable del diámetro hidrodinámico de esta preparación.

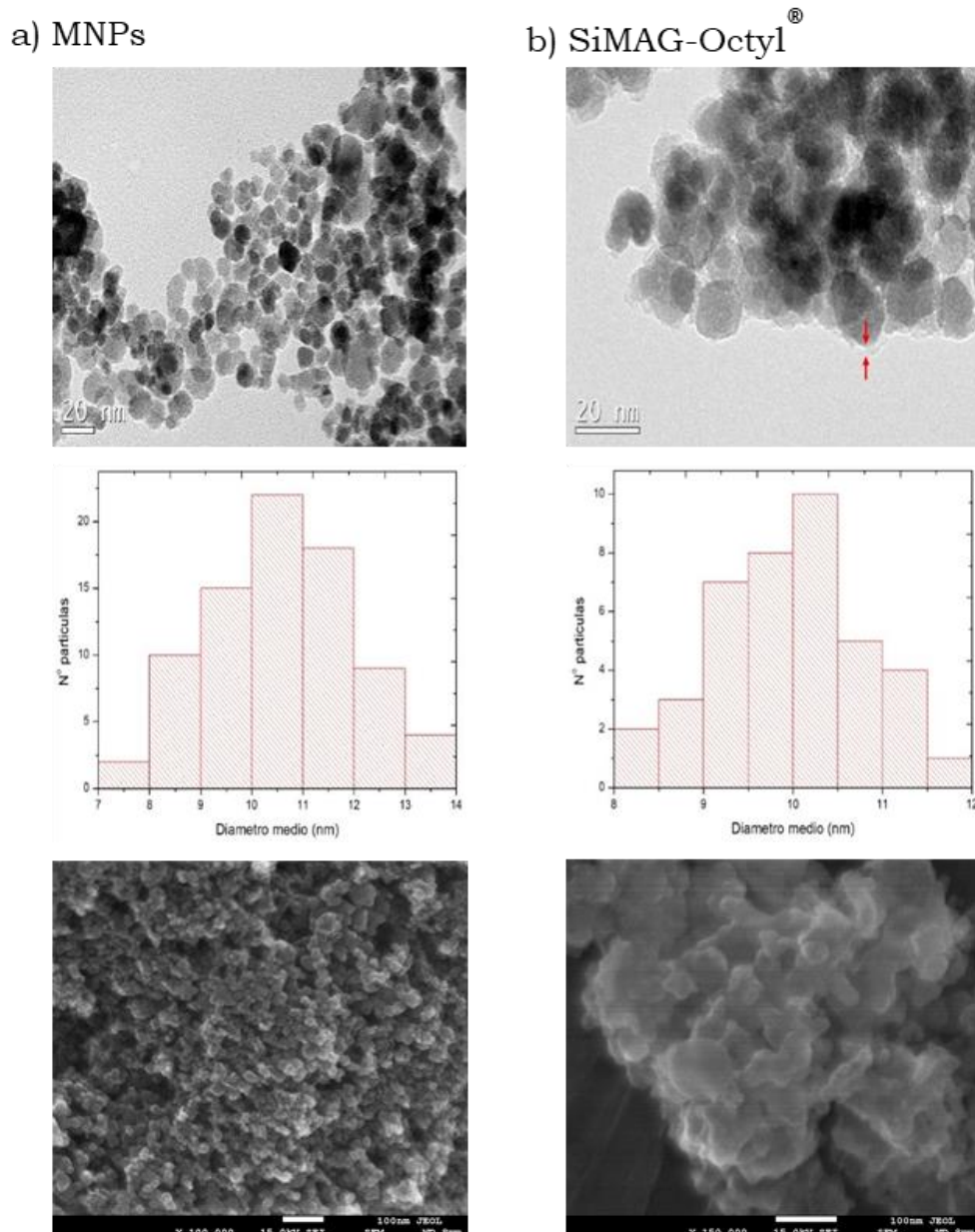


Figura 4.2. Análisis mediante microscopía electrónica. a) Nanopartículas de magnetita (MNPs). b) Nanopartículas comerciales SiMAG-Octyl<sup>®</sup>. Material orgánico señalado con flechas rojas. Paneles superiores: micrografías de TEM; centro: distribución de tamaños; abajo: micrografías de SEM.

#### 4.2.1.3. Espectroscopía de Infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de los soportes magnéticos MNPs, AMNPs y AMNPs-GA (Figura 4.3), muestran una banda de absorción con una intensidad máxima centrada en torno a  $580\text{ cm}^{-1}$ , que puede atribuirse al FeOH-O, en la estructura inversa tipo espinela del

Fe, en posiciones tetraédricas (Vadivel *et al.*, 2015). Según la bibliografía consultada, las bandas alrededor de 1.090 y 1.190  $\text{cm}^{-1}$  detectadas en los soportes silanizados y funcionalizados corresponden a la presencia de grupos SiO-H y Si-O-Si (Cao *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2018), y la observada en torno a 800  $\text{cm}^{-1}$  puede asignarse al modo de vibración de flexión de los enlaces Si-O (Griffiths, 1992). Estas bandas debidas al Si son muy intensas en el espectro del soporte comercial SiMAG-Octyl, y mucho más tenues en los de las AMNP y AMNP-GA, que poseen un recubrimiento mucho más fino. La presencia de una capa gruesa de sílice en las SiMAG-Octyl<sup>®</sup>, había sido ya observada en las imágenes de TEM (Figura 4.2 b, arriba). Las señales registradas en la región entre 1.400-1.500  $\text{cm}^{-1}$  pueden deberse a los grupos CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> de las cadenas alquílicas introducidas en la funcionalización. La banda centrada a 1.647  $\text{cm}^{-1}$  se puede atribuir ya sea a vibraciones de flexión H-O-H del agua o a vibraciones de estiramiento N-H (Bini *et al.*, 2012), que se justifican por la incorporación de grupos amino en AMNPs y AMNPs-GA. Por otra parte, en las muestras tratadas con GA se observa un ensanchamiento de esta banda, con multitud de señales pequeñas y poco definidas entre 1.647 y 1.750  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a los grupos aldehído incorporados sobre el soporte (Thangaraj *et al.*, 2016).

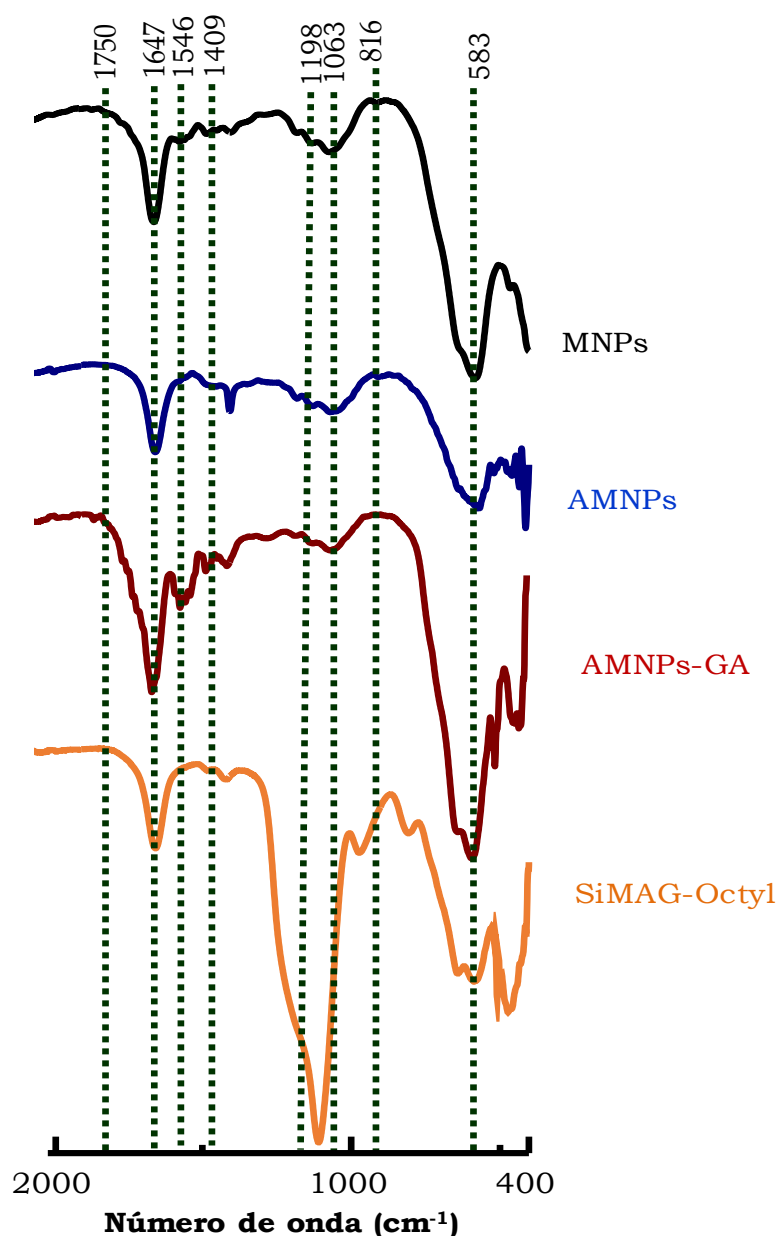


Figura 4.3. Espectros FTIR de las nanopartículas magnéticas desnudas (MNPs), funcionalizadas con grupos aminos (AMNPs), activadas con grupos aldehído (AMNPs-GA) y el soporte comercial SiMAG-Octyl®.

#### 4.2.1.4. Magnetismo

Cuando un material ferromagnético ha estado sometido a un campo magnético y éste cesa, el material conserva un cierto magnetismo residual. Este fenómeno se conoce como histéresis magnética. La medida de la curva de histéresis aporta



parámetros indicadores de su comportamiento magnético, que son característicos de cada material. Los ciclos de histéresis obtenidos para las muestras de las MNPs y los nanobiocatalizadores (Figura 4.4 a), mostraron una fuerte respuesta magnética a la aplicación de un campo magnético variable. El valor de la magnetización de saturación ( $M_s$ ) de ambos tipos de muestras fue similar, de alrededor de 70 Oe/g, e inferior a los 92 Oe/g esperados para la magnetita (Petrovský, E., Herrero-Bervera, E., Harinarayana, T., Ivers, 2011). Esto es compatible con la presencia de maghemita en estas muestras, tal y como se detectó mediante datos de difracción de rayos X, ya que este compuesto tiene menor valor de  $M_s$  (82 Oe/g) que la magnetita (Tural *et al.*, 2009). El valor del momento magnético de los nanobiocatalizadores fue similar al del soporte desnudo, a pesar de la capa de sílice no magnética (APTS) y la enzima inmovilizada sobre su superficie (Cao *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2018). Esta capa de material no magnético es muy fina por lo que no conduce a una reducción de la magnetización general.

La Figura 4.4 b muestra las curvas de histéresis del soporte comercial SiMAG-Octyl® y del nanobiocatalizador SiMAG-Octyl-OPeR. En este caso, tampoco se observaron diferencias notables en el valor de  $M_s$  antes y después de inmovilizar la lipasa, aunque es destacable que dicho valor (50 Oe/g) es mucho menor que el de la magnetita. Este hecho, que puede afectar negativamente a la recuperación de la enzima inmovilizada para su reciclado, probablemente se debe a la presencia del material orgánico observado sobre las nanopartículas por microscopía electrónica.



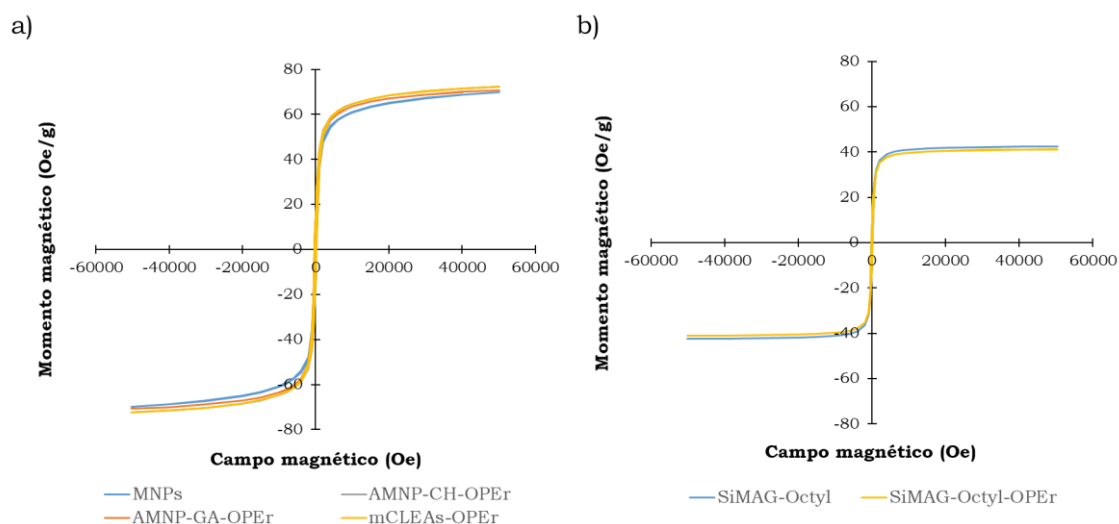


Figura 4.4. Curvas de histéresis, mostrando la variación del momento magnético *vs.* el campo aplicado para: a) las nanopartículas magnéticas desnudas (MNPs) y los nanobiocatalizadores con este soporte, y b) el soporte funcionalizado comercial SiMAG-Octyl® y el nanobiocatalizador SiMAG-Octyl-OPER.

#### 4.2.2. Caracterización de los soportes no magnéticos

Estos soportes son materiales completamente nuevos, y se han caracterizado mediante técnicas estándar.

##### 4.2.2.1. Análisis mediante difracción de rayos X (XRD)

Los óxidos mixtos de Mn/Zn G1 y G4 presentan una pureza elevada (95-96%). Su simetría cristalina y su estequiometría fueron examinadas mediante XRD, refinando la estructura mediante el análisis de Rietveld.

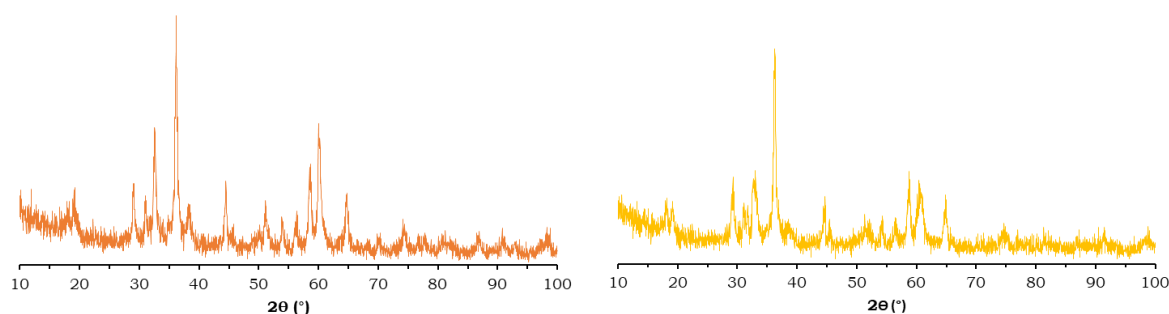


Figura 4.5. Patrones de difracción de rayos X de los soportes no magnéticos G1 (izquierda) y G4 (derecha).

Los patrones de difracción de RX de estas partículas (Figura 4.5), muestran señales atribuibles a una simetría tetragonal y a una estructura tipo espinela, en concordancia con la base de datos JCPDS, No. 24-1133.

En la Tabla 4.2 se recoge la composición en fases cristalinas de las nanopartículas sintetizadas. Los perfiles de RXD se refinaron por el método de Rietveld, considerando la estructura de tipo espinela, permitiendo observar la variación en las proporciones Mn/Zn entre G1 y G4.

Tabla 4.2. Estequiometría de los nuevos óxidos Zn/Mn, empleados como soportes para la inmovilización de enzimas.

Soporte	Estequiometría
G1	$\text{Zn}_{0,25}\text{Mn}_{2,75}\text{O}_4$
G4	$\text{Zn}_{0,85}\text{Mn}_{2,15}\text{O}_4$

#### 4.2.2.2. Visualización mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido de los soportes no magnéticos

Las nanopartículas G1 y G4 fueron también observadas por TEM y SEM (Figura 4.6). Al contrario que las MNPs, estas nanopartículas no tienen ni forma ni tamaño homogéneos, por lo que resulta imposible dar un valor de su diámetro medio, pero en general su tamaño ( $> 50$  nm) es mayor que el de los soportes magnéticos. Dado que su síntesis se llevó a cabo a partir de un residuo, mediante un nuevo procedimiento no industrial y en el que no se utiliza un molde, la heterogeneidad de estos materiales es esperable. A la vista de las imágenes podemos decir que las nanopartículas G1 son menores que las G4.

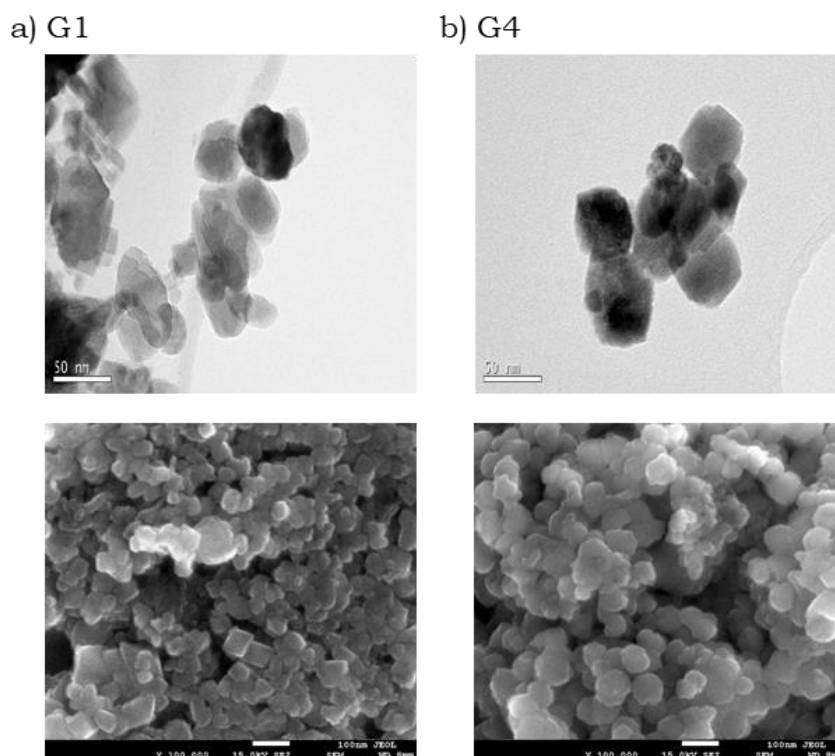


Figura 4.6. Micrografías de TEM (arriba) y SEM (abajo) de los soportes no magnéticos: a) G1 y b) G4.

#### 4.2.2.3. FTIR

Los espectros FTIR de las nanopartículas G1 y G4 (Figura 4.7) no presentaron diferencias destacables entre sí, ya que solo se distinguen en la estequiometría de sus componentes.

La banda a  $534\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a las vibraciones de Mn-O, y la banda en torno a  $636\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con la espinela  $\text{ZnMn}_2\text{O}_4$  (Zhang *et al.*, 2011). En los soportes funcionalizados se observa una banda a  $1.063\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la presencia de los grupos SiO-H. La banda a  $1.647\text{ cm}^{-1}$  se intensifica en las muestras funcionalizadas debido a las vibraciones de estiramiento N-H de los grupos amino libres (Bini *et al.*, 2012).

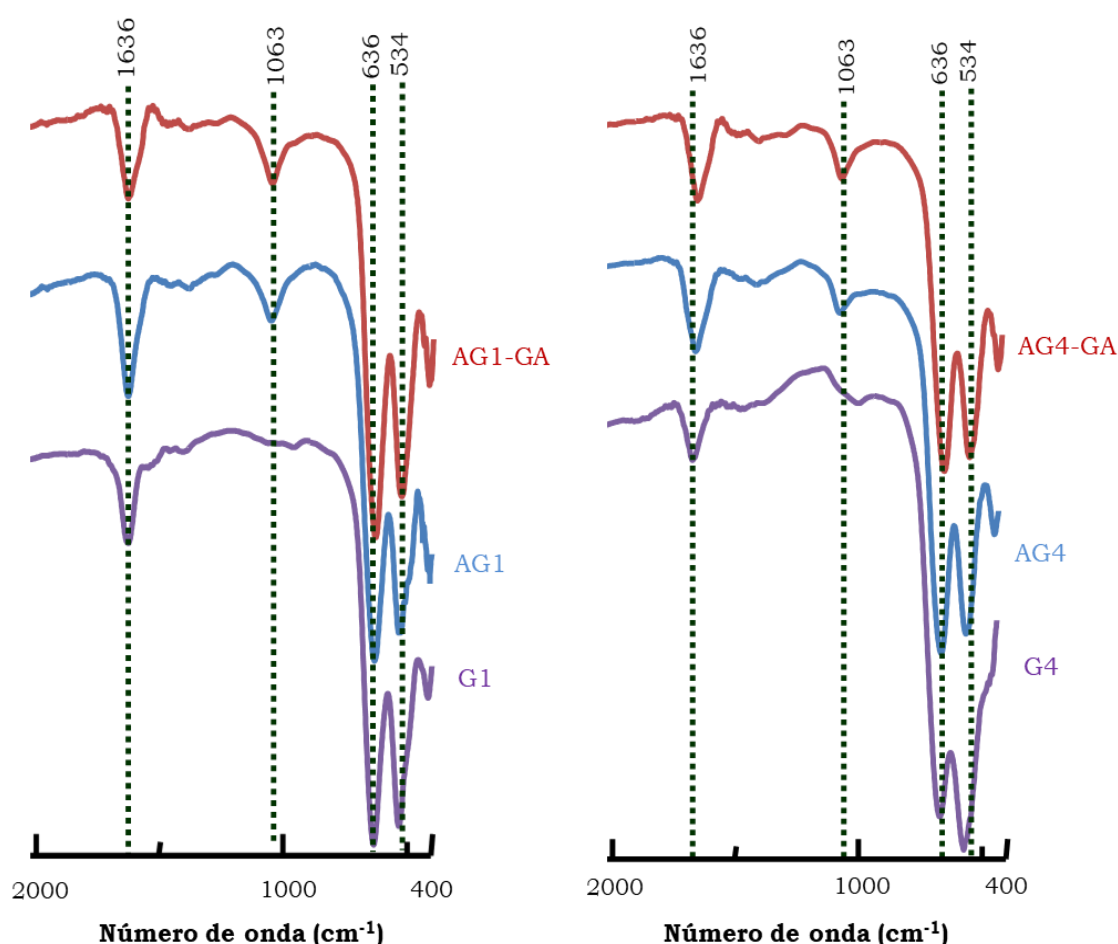


Figura 4.7. Espectros FTIR de las nanopartículas G1 y G4 desnudas y funcionalizadas con grupos amino (AG1 y AG4) o aldehído (AG1-GA y AG4-GA).

#### 4.2.3. Determinación de la densidad de grupos amino superficiales en los soportes amino-funcionalizados

Tras la silanización y funcionalización con el reactivo APTS, se midió la cantidad de grupos amino disponibles incorporados en los soportes AMNPs, AG1 y AG4. En los todos ellos, la cantidad promedio de grupos amino incorporados a las nanopartículas fue de  $10,8 \pm 3,4 \mu\text{mol/g}$  de soporte, siendo este valor comparable al reportado en algunas especificaciones técnicas de preparaciones comerciales.

### 4.3. Inmovilización de OPEr y otras lipasas

La inmovilización de una proteína implica su fijación a un soporte sólido insoluble. Si la actividad de la enzima resiste este proceso, el biocatalizador inmovilizado es, en muchas ocasiones, más estable que la enzima libre, y puede separarse fácilmente del medio de reacción, dejando los productos resultantes más limpios y, además, puede reutilizarse (Adlercreutz, 2013; Bernal *et al.*, 2018; Cao, 2005; Cipolatti *et al.*, 2016; Sheldon and van Pelt, 2013; Sheldon and Woodley, 2018; Shuai *et al.*, 2017). Sin embargo, no es fácil predecir cuál de los múltiples métodos de inmovilización disponibles será el más adecuado para producir un biocatalizador robusto para una determinada aplicación. La introducción de funcionalidades específicas en la superficie proteica mediante ingeniería genética, para el acoplamiento orientado y preciso de algunas proteínas (Molina-Espeja *et al.*, 2019), es una de las pocas aproximaciones racionales existentes para ello. Pero, en general, hay que tener en cuenta que el mejor método de inmovilización difiere de enzima a enzima, de aplicación a aplicación y de soporte a soporte y, por tanto, la única aproximación posible es la de ensayo y error (Cao, 2005).

En este apartado examinaremos los resultados de la inmovilización de OPEr mediante varias aproximaciones. La mayor parte del trabajo se ha realizado utilizando soportes magnéticos, evaluando cuál era la carga enzimática óptima para la inmovilización sobre estos soportes. Aunque el área superficial de las nanopartículas magnéticas es alta, hay que tener en cuenta que, al no ser porosos, la inmovilización es exclusivamente superficial, lo que impide el uso de grandes cantidades de proteína. Tras la inmovilización, se midió la actividad residual en los sobrenadantes y la actividad inmovilizada en el nanobiocatalizador y, a partir de estas determinaciones, se calcularon los parámetros que indican la eficiencia global de los distintos procedimientos ensayados. Es importante destacar que el rendimiento de inmovilización de las lipasas se determina valorando su actividad residual en el sobrenadante (sección 3.9.3), no la proteína residual. La medida

de la proteína no inmovilizada podría dar una visión distorsionada de cómo se inmoviliza la lipasa, ya que otras proteínas presentes en el crudo pueden inmovilizarse de una forma diferente (Sheldon and van Pelt, 2013).

Sobre estos mismos soportes, también se han inmovilizado covalentemente lipasas comerciales con el fin de comparar su eficiencia en determinadas aplicaciones.

Los nuevos óxidos mixtos funcionalizados solo se evaluaron como soportes para la inmovilización covalente de OPEr. El listado de todos los biocatalizadores sintetizados en este trabajo se recoge en la Tabla 3.5 (sección 3.9).

#### **4.3.1. Inmovilización no covalente sobre MNPs**

La inmovilización mediante interacción hidrofóbica es un mecanismo ideal para proteínas muy hidrofóbicas, como las lipasas, y el procedimiento es muy sencillo y rápido. Entre otras ventajas adicionales, cabe destacar que, dada la afinidad excepcionalmente alta de las lipasas por soportes hidrofóbicos, simultáneamente a la inmovilización tiene lugar su purificación total o parcial, y además que la enzima se inmoviliza en su conformación abierta. Esto es así porque los grupos alquílicos situados en la superficie del soporte inducen la apertura de la tapa, dejando expuesta la región hidrofóbica que conecta el centro activo con el exterior. Por tanto, la unión establecida con el soporte es muy intensa y la enzima queda estabilizada en dicha conformación (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Mateo *et al.*, 2007; Palomo and Guisan, 2012; Rodrigues *et al.*, 2019; Tacias-Pascacio *et al.*, 2016).

Sin embargo, a pesar de los excelentes resultados de este tipo de inmovilización, las interacciones no covalentes pueden resultar poco estables, tanto de cara a su almacenamiento como en las condiciones utilizadas en los procesos industriales, y con frecuencia la enzima va desprendiéndose del soporte por cambios en el pH, concentración salina o temperatura, contaminando el

producto final. No obstante, en medios no acuosos el lixiviado de la enzima es mínimo (Rodrigues *et al.*, 2019; Torres-Salas *et al.*, 2011b).

En este trabajo, se inmovilizó OPEr mediante interacción hidrofóbica utilizando un soporte magnético comercial funcionalizado con grupos octilo (SiMAG-Octyl®). La carga enzimática óptima se determinó añadiendo concentraciones de proteína de entre 4 y 40 µg/mg soporte y permitiendo su interacción durante unos minutos en condiciones muy suaves, a pH neutro, lo que contribuye al mantenimiento de la actividad.

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados del rango de carga enzimática analizado. Se puede observar que la eficiencia de la inmovilización disminuye notablemente a partir de una determinada carga enzimática, indicando que el soporte está saturado. A las dosis de proteína más bajas se inmovilizó la totalidad de la lipasa, pero la actividad del nanobiocatalizador es también muy baja.

Tabla 4.3. Efecto de la carga de proteína en la inmovilización no covalente de crudos de OPEr sobre nanopartículas magnéticas comerciales funcionalizadas con grupos octilo (SiMAG-Octyl®). Actividad lipasa determinada frente a pNPB.

Proteína ofrecida (µg/mg soporte)	Ai (mU/mg soporte)	Rdto. Inmov. (%) <sup>a</sup>	Ae (mU/mg soporte)	Eficiencia (%) <sup>b</sup>	Actividad recuperada (%) <sup>c</sup>
<b>4</b>	300	100	235	78	78
<b>10</b>	750	100	641	85	85
<b>14</b>	<b>1050</b>	<b>99</b>	<b>843</b>	<b>81</b>	<b>80</b>
<b>20</b>	1500	98	1054	72	70
<b>40</b>	3750	69	1148	44	31

<sup>a</sup>Rendimiento inmovilización =  $100 \times (Ar/Ai)$

<sup>b</sup>Eficiencia =  $100 \times (Ae/Ai - Ar)$

<sup>c</sup>Actividad recuperada =  $100 \times (Ae/\text{Actividad inicial})$

Ai: actividad inicial ofrecida; Ar: actividad residual; Ae: actividad específica



Por esta razón, en este caso se eligió una concentración de proteína de 14  $\mu\text{g}/\text{mg}$  soporte como carga óptima. En estas condiciones, la actividad inmovilizada fue 843 mU/mg de soporte, indicando que se había inmovilizado en forma activa el 80% de la lipasa ofrecida (1050 mU<sub>pNPB</sub>). Puesto que este método es muy eficiente y preserva la actividad de OPEr, el valor máximo de actividad inmovilizada por hidrofobicidad a cada una de las cargas proteicas ensayadas podría servir como referencia del máximo esperable para la unión de la lipasa a los otros soportes.

En este caso, en el que OPEr no solo es la única lipasa existente en el crudo enzimático, sino también la proteína más hidrofóbica, el nanobiocatalizador SiMAG-Octyl-OPEr está muy enriquecido en la lipasa. De hecho, esta misma funcionalidad (grupos octilo) se usa en las columnas de cromatografía líquida empleadas para la purificación de OPEr (Vaquero *et al.*, 2015a). Ello explica los altísimos rendimientos de inmovilización, ya que la mayor parte de las restantes proteínas del crudo quedan en el sobrenadante sin fijarse al soporte (Figura 4.8). Teniendo en cuenta que trabajamos con crudos enzimáticos, este hecho marca una importante diferencia con los demás nanobiocatalizadores de OPEr sintetizados en esta Tesis.

Aunque la activación interfacial se ha descrito como causa de hiperactivación en algunas lipasas (De Melo *et al.*, 2017; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Shuai *et al.*, 2017; Tacias-Pascacio *et al.*, 2016), en OPEr nunca se ha observado claramente este fenómeno. Recordemos que OPEr es una lipasa versátil, con una marcada actividad esteroles esterasa, y esta hiperactivación no se ha descrito en esteroles esterasas.



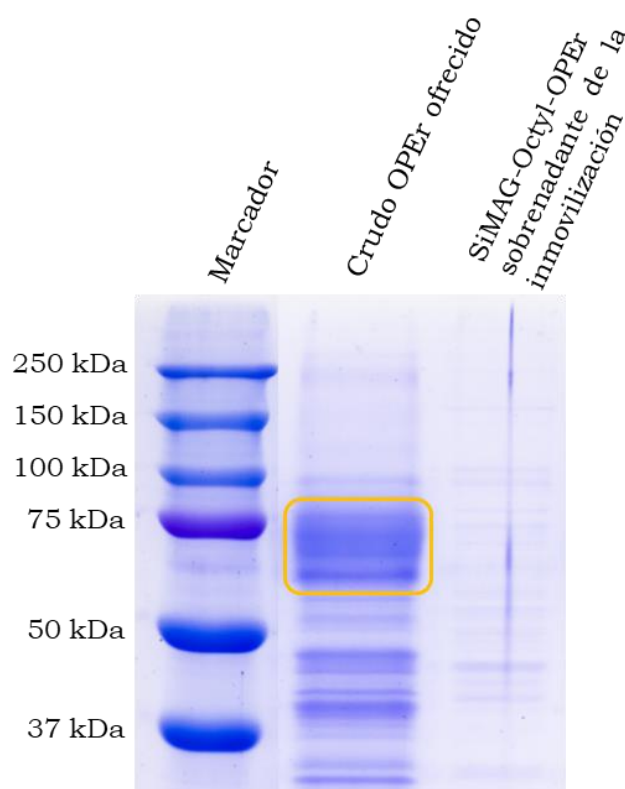


Figura 4.8. Gel de electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo de OPer (recuadrado en amarillo están las bandas correspondientes a la enzima OPer) y de la proteína residual en el sobrenadante, tras la inmovilización.

En ninguno de los ensayos realizados en este trabajo se detectó que la actividad inmovilizada superara el valor de la actividad inicial, sino más bien al contrario. De hecho, en las condiciones seleccionadas como óptimas hay una pérdida de actividad del 20% en el catalizador final, a pesar de que el 99% de la lipasa ofrecida se había inmovilizado (Tabla 4.3). Esto podría deberse a una limitada accesibilidad del sustrato al sitio catalítico de algunas de las moléculas de OPer debido a su aglomeración (Zaak *et al.*, 2017). Son escasos los trabajos que tratan la inmovilización de lipasas sobre MNPs con grupos octilo (Mosayebi *et al.*, 2020), pero muchos hablan sobre la unión hidrofóbica a perlas de agarosa con esta misma cadena alquílica, obteniendo rendimientos de alrededor del 100% y sin pérdida de actividad una vez la enzima está inmovilizada (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Virgen-Ortíz *et al.*, 2017; Zaak *et al.*, 2017). Hay también multitud de ejemplos de lipasas inmovilizadas

sobre otros soportes con grupos funcionales hidrofóbicos con muy distintos rendimientos (Albuquerque *et al.*, 2016; Arana-Peña *et al.*, 2018; Fernandez-Lopez *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2019; Tacias-Pascacio *et al.*, 2016; Zaak *et al.*, 2017).

#### **4.3.2. Inmovilización covalente sobre MNPs**

Los procedimientos ensayados para la unión covalente de OPEr a las nanopartículas magnéticas fueron muy diferentes entre sí. Uno de ellos se basa en la activación del soporte aminado con glutaraldehído y la posterior unión covalente de las proteínas a través de determinados aminoácidos. Esta metodología es, probablemente, la más empleada para la inmovilización de enzimas (De Melo *et al.*, 2017). Los otros dos métodos son menos convencionales. En el segundo de ellos, las (glico)proteínas se unen a los grupos amino del soporte, a través de aldehídos generados en sus cadenas glucídicas, de modo que la porción proteica de la enzima no participa directamente en dicha unión. El tercero combina un primer paso de interacción física entre las proteínas y el soporte magnético, que va seguido de la formación de agregados proteicos y su entrecruzamiento covalente.

En los casos en los que la cadena peptídica interviene en la unión al soporte, es preciso recordar que solo algunos de los 20 aminoácidos proteicos son susceptibles de mediar esta unión gracias a su reactividad (Figura 4.9). La participación de unos u otros dependerá del grupo funcional incorporado al soporte y de las condiciones en las que se lleve a cabo la inmovilización (Cao, 2005).

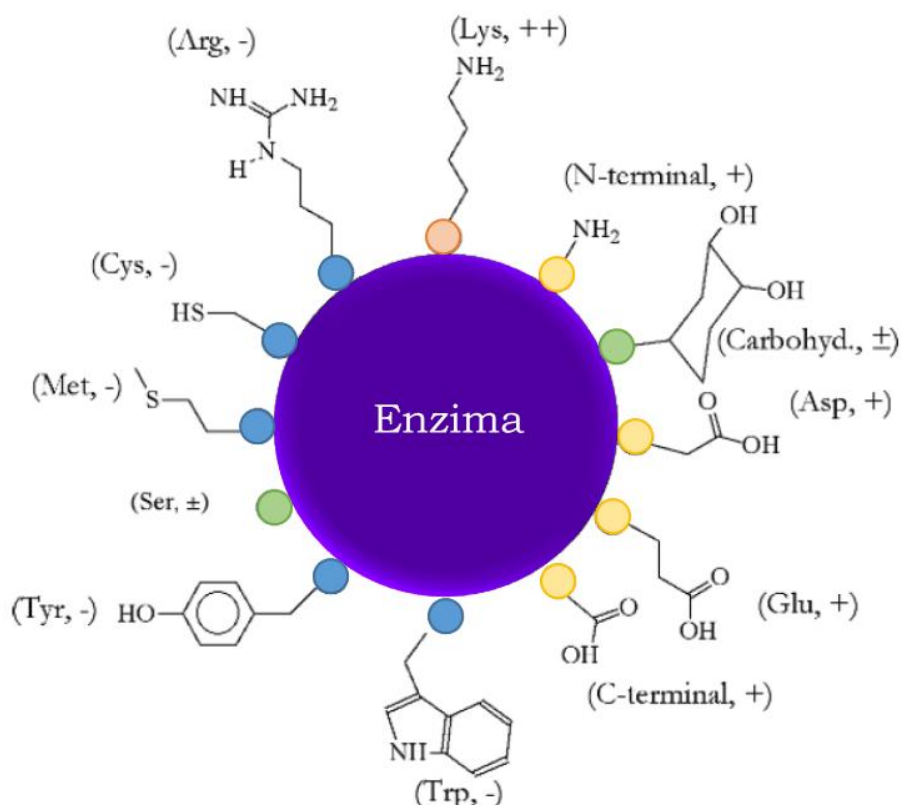


Figura 4.9. Esquema de los aminoácidos que pueden servir de anclaje en la inmovilización: ++ (rojo) usados muy frecuentemente; + (amarillo) usados frecuentemente; ± (verde) no usados frecuentemente; – (azul) no usados. Adaptado de Cao (2005).

#### 4.3.2.1. Inmovilización mediante unión de la cadena proteica al soporte AMNP-GA

Como acabamos de comentar, el soporte AMNP-GA empleado para inmovilizar OPEr mediante este procedimiento se preparó por tratamiento de las AMNPs con glutaraldehído, un reactivo bifuncional ampliamente utilizado para este propósito que interacciona principalmente con grupos amino primarios de las proteínas (Barbosa *et al.*, 2014; Betancor *et al.*, 2006). Según en qué condiciones tenga lugar la inmovilización, también puede interaccionar con aminoácidos que contengan tioles, imidazoles u otros aminoácidos (Modenez *et al.*, 2018). A pesar de su uso generalizado como agente entrecruzante, aún no se conoce exactamente cómo se comporta el glutaraldehído en solución acuosa, aunque se sabe que existe en múltiples formas (Barbosa

*et al.*, 2014). A valores de pH entre 3 y 8, y en soluciones diluidas, parece encontrarse en forma monomérica, como aldehídos o hemiacetales cíclicos estables, mientras que a pH alcalino se forman aldehídos oligoméricos por condensación aldólica (De Melo *et al.*, 2017). En nuestro caso, la activación del soporte se realizó empleando una solución 250 mM de glutaraldehído en agua (sección 3.8.3), por lo que presumiblemente se unirían al amino una o dos de las formas monoméricas, dando lugar a un soporte heterofuncional (Betancor *et al.*, 2006). Por esta razón, la fuerza iónica a la que se realice la inmovilización condiciona el tipo de mecanismo por el que se fijan las proteínas (Barbosa *et al.*, 2014; De Melo *et al.*, 2017). A valores elevados o bajos se produce una primera interacción de las proteínas por adsorción, hidrofóbica en el primer caso, y aniónica, en el segundo, mientras que a valores moderados las proteínas forman directamente el enlace covalente. De acuerdo con el estudio realizado por Betancor *et al.* (2006), podemos sugerir que, en las condiciones de concentración salina media-baja (100 mM) elegidas para la inmovilización de OPEr en este soporte, podría existir bien una unión covalente directa, o bien una etapa inicial de interacción iónica, seguida de una reacción intermolecular muy rápida entre los nucleófilos de las proteínas y los aldehídos del soporte.

La particular reactividad del glutaraldehído hace posible que los enlaces entre los aldehídos libres del soporte y los grupos funcionales de la cadena polipeptídica se establezcan a valores de pH moderados. Así, se evita la exposición de las proteínas a las condiciones fuertemente alcalinas que serían necesarias para hacer reactivos los grupos nucleófilos superficiales de las proteínas (Barbosa *et al.*, 2014; De Melo *et al.*, 2017), y además se forma un enlace covalente estable sin usar un agente reductor (Santos *et al.*, 2015). A pH alcalino, la unión se establece generalmente con los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas, que son altamente nucleófilos, formando bases de Schiff mediante adición de Michael, o compuestos de piridinio cuaternarios (Modenez *et al.*, 2018).

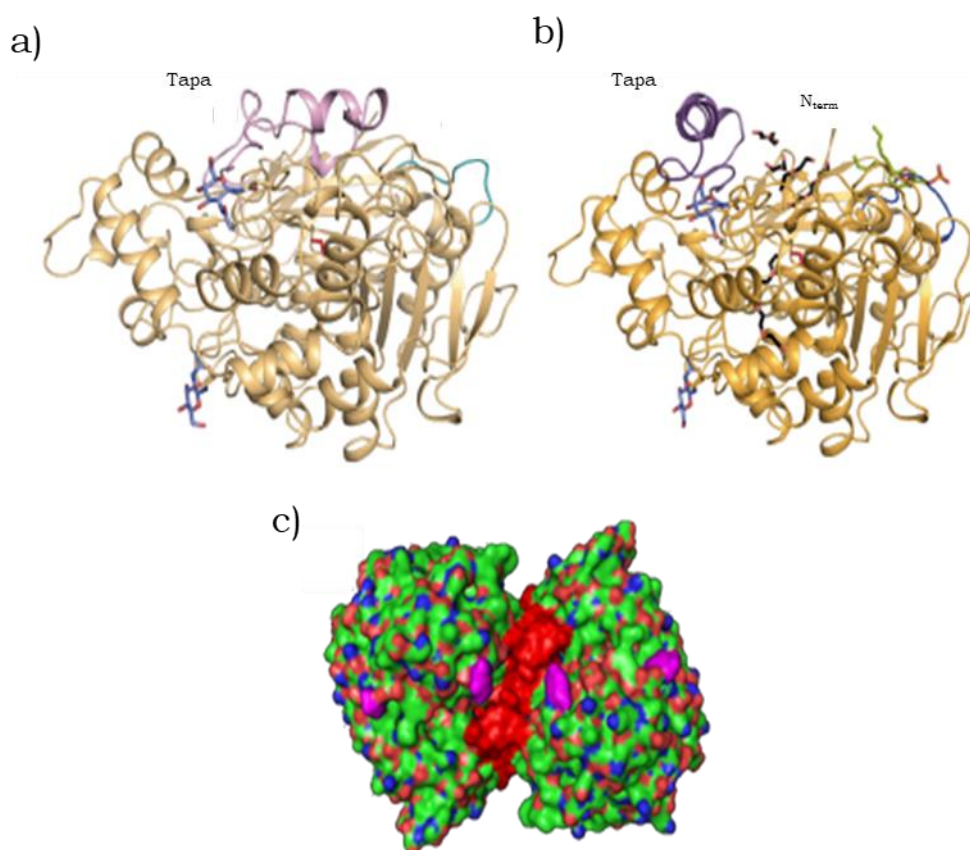


Figura 4.10. Estructura de OPEr en su conformación: a) abierta y b) cerrada, c) Dímero de OPEr mostrando en rojo la zona de acceso de los sustratos y los 4 sitios de glicosilación (2 en cada monómero) en magenta. Los más exteriores, que corresponden con N380, están en la salida del túnel. Modificada de Vaquero (2016).

En nuestro caso, la inmovilización se hizo a pH neutro, siendo poco probable que los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas superficiales estén activados puesto que su pKa es muy elevado. En estas condiciones, es muy posible que las proteínas se hayan unido al soporte principalmente por su aminoácido N-terminal (Barbosa *et al.*, 2014), aunque no podemos excluir la intervención de otras regiones con grupos amino reactivos a pH neutro. A pesar de la proximidad del aminoácido N-terminal a la región de la tapa (Figura 4.10), parece que la inmovilización a través de este punto no afecta a su apertura, puesto que el biocatalizador inmovilizado es activo.

Tabla 4.4. Efecto de la carga de proteína en los parámetros de inmovilización de OPEr sobre nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos aldehído (AMNP-GA-OPEr). Actividad lipasa determinada frente a pNPB.

<b>Proteína ofrecida (μg/mg soporte)</b>	<b>Ai (mU/mg soporte)</b>	<b>Rdto inmov. (%)<sup>a</sup></b>	<b>Ae (mU/mg soporte)</b>	<b>Eficiencia (%)<sup>b</sup></b>	<b>Actividad recuperada (%)<sup>c</sup></b>
<b>4</b>	300	95 ± 0	222 ± 4	78	74
<b>10</b>	<b>750</b>	<b>65 ± 8</b>	<b>334 ± 5</b>	<b>69</b>	<b>45</b>
<b>14</b>	1050	53 ± 0	331 ± 4	59	32

<sup>a</sup>Rendimiento inmovilización = 100 x (Ar/Ai)

<sup>b</sup>Eficiencia = 100 x (Ae/Ai-Ar)

<sup>c</sup>Actividad recuperada = 100 x (Ae/Actividad inicial)

Ai: actividad inicial ofrecida; Ar: actividad residual; Ae: actividad específica

La Tabla 4.4 recoge los resultados de la determinación de la carga enzimática óptima para la inmovilización por de OPEr sobre el soporte AMNP-GA, que se realizó de la misma forma que en el caso anterior, a partir de 4 μg de proteína total (300 mU) por mg de soporte. Puesto que los nanobiocatalizadores producidos utilizando una actividad inicial de 750 mU y 1050 mU por mg de soporte mostraron una actividad específica similar pero los parámetros relacionados con la inmovilización empeoraron a la dosis más alta, no se ensayaron dosis superiores. La carga enzimática aceptada por las nanopartículas activadas con glutaraldehído es muy baja, y se eligió como óptima una concentración de proteína de 10 μg/mg soporte, que corresponde a una actividad inicial total de 750 mU por mg de soporte.

El valor máximo de actividad inmovilizada en AMNP-GA-OPEr (334 mU/mg soporte) es la mitad del determinado para las SiMAG-Octyl-OPEr a la misma carga proteica, y un 69% inferior a la observada a la concentración óptima elegida (1.054 mU/mg). No podemos atribuir esta baja actividad a potenciales efectos negativos del glutaraldehído sobre la actividad de OPEr, ya que se detecta un 35% de lipasa activa en el sobrenadante que no ha



podido fijarse al soporte. Los factores que contribuyen a este resultado pueden ser varios. El extremo N-terminal de OPEr, por el que suponemos que se está produciendo principalmente la inmovilización, está muy próximo a uno de los puntos de N-glicosilación. Esta enzima tiene un 28% de N-glicosilación (Vaquero *et al.*, 2015a) y las cadenas glucídicas podrían interferir en la interacción de las zonas reactivas de la proteína con el soporte y, por tanto, esto podría explicar la baja carga enzimática que éste acepta. También podría ocurrir que, al unirse la cadena polipeptídica al soporte, a través de un espaciador de brazo corto (el GA), y tal vez por unión multipunto a través de otros aminoácidos, la lipasa quede rígida en una orientación ineficiente, dificultando la catálisis al obstaculizar la entrada o la acomodación del sustrato (Barbosa *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Esto podría ser más evidente con sustratos voluminosos (como los triglicéridos o fitoesteres), pero en el caso del *p*NPB la molécula es pequeña. Además se ha descrito que, en general, la rigidización producida por este tipo de inmovilización suele ir acompañada de una estabilización estructural de la proteína inmovilizada, haciéndola menos propensa a la desnaturalización y favoreciendo el mantenimiento de su actividad (Mateo *et al.*, 2007). Otro factor que podría dar cuenta de la baja actividad retenida sería la ocupación de grupos activos del soporte por otras proteínas del crudo.

Tabla 4.5. Comparación de los principales parámetros de la inmovilización covalente sobre AMNP-GA- de las lipasas estudiadas. Actividad lipasa determinada frente a *p*NPB.

Lipasa	Ai (mU/mg soporte)	Rdto. Inmov. (%) <sup>a</sup>	Ae (mU/mg soporte)	Actividad recuperada (%) <sup>b</sup>
<b>OPEr</b>	<b>750</b>	<b>56 ± 7</b>	<b>342 ± 60</b>	<b>45</b>
<b>Cal A<sup>®</sup></b>	750	30 ± 4	184 ± 28	25
<b>Cal B<sup>®</sup></b>	750	10 ± 1	76 ± 6	10
<b>Eversa<sup>®</sup></b>	750	58 ± 5	280 ± 58	37
<sup>a</sup> Rendimiento inmovilización = 100 x (Ar/Ai)				
<sup>b</sup> Actividad recuperada = 100 x (Ae/Actividad inicial)				

Las lipasas comerciales Cal A<sup>®</sup>, Cal B<sup>®</sup> y Eversa<sup>®</sup> también se inmovilizaron mediante este procedimiento, para comparar su actividad con la de OPEr en ciertas aplicaciones. Hemos de recordar en este punto que la actividad frente a *p*NPB de cada una de las preparaciones de lipasas ensayadas es muy diferente, y que, aunque se utilice la misma actividad inicial, cada una de ellas corresponde a una cantidad diferente de proteína (Tabla 4.1). Los resultados de estos ensayos se recogen en la Tabla 4.5.

Podemos observar dos comportamientos diferentes en las cuatro preparaciones estudiadas. Los parámetros de inmovilización de Eversa<sup>®</sup> y OPEr fueron similares, con mejores valores que los determinados para las lipasas de *C. antarctica*. Monteiro *et al.* (2019) inmovilizaron Cal A<sup>®</sup> sobre MNPs recubiertas de quitosano y activadas con GA, con un rendimiento de inmovilización del 84%. Este buen dato puede deberse a que probablemente la proporción de grupos NH<sub>2</sub> reactivos en el quitosano es muy superior a la de nuestro soporte amino-funcionalizado, permitiendo la unión de más grupos aldehído y, por lo tanto, de más proteína. En cuanto a Cal B<sup>®</sup>, López *et al.* (2014) describen rendimientos de inmovilización del 50% sobre un soporte similar al nuestro y Barbosa *et al.* (2012) obtuvieron valores ligeramente inferiores utilizando amino-agarosa activada con GA, aunque la estabilidad de la preparación era menor. Otros autores no describen los resultados de los parámetros de inmovilización, aunque refieren la eficiencia de la enzima inmovilizada y su mayor estabilidad frente a la enzima libre (Miao *et al.*, 2018).

Los datos registrados para la inmovilización covalente de otras lipasas sobre AMNP-GA son muy variables, con rendimientos de entre 50-90% dependiendo de la carga enzimática ofrecida y la concentración de glutaraldehído, con actividades recuperadas de 30-96%. Según Cui *et al.* (2010), la actividad retenida en la inmovilización de la lipasa de *C. rugosa* sobre AMNPs con GA fue del 58%. De Melo *et al.* (2017) describen



un rendimiento de inmovilización del 100% y para esta misma enzima y para la lipasa bacteriana LipC12, con actividades recuperadas del 95% para CRL y del 42% para LipC12. Xie and Ma (2009) inmovilizaron la lipasa comercial Lipozyme-TL de la misma manera, con una retención de actividad del 70%.

#### **4.3.2.2. Inmovilización mediante unión covalente de aldehídos generados en las cadenas glucídicas al soporte AMNP**

En general, las lipasas extracelulares expresadas en hongos y levaduras son glicoproteínas (Barriuso *et al.*, 2016). Las cuatro lipasas empleadas en este trabajo lo son, y por tanto poseen cadenas superficiales de azúcares que pueden oxidarse parcialmente con  $\text{NaIO}_4$ , generando grupos aldehído. Se ha descrito que, realizado en condiciones suaves, este tratamiento afecta a los carbohidratos sin producir efectos negativos en la estructura o en la antigenicidad de las proteínas (Andersen *et al.*, 1966; Nakamura *et al.*, 1976). Así pues, los aldehídos pueden emplearse para anclar la proteína de interés a grupos amino del soporte, sin implicar a la cadena peptídica en esta unión, y los carbohidratos oxidados actuarían como brazos largos y ligeramente flexibles (Knezevic *et al.*, 2006). Dicha flexibilidad podría facilitar la adaptación de la estructura de la enzima para permitir el acceso de sustratos voluminosos, aunque también podría hacerla más susceptible a la inactivación (Barbosa *et al.*, 2014; Mateo *et al.*, 2007). Este método ha sido utilizado para la inmovilización de la lipasa tipo VII de *C. rugosa*, sobre el soporte aminado Eupergit C, no observándose pérdida de actividad (Knezevic *et al.*, 2006; Milosavić *et al.*, 2017).

Los resultados de la optimización de la carga proteica de OPEr para su inmovilización, mediante este procedimiento, se presentan en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Efecto de la carga proteica en la inmovilización covalente de OPEr mediante unión de aldehídos, generados en las cadenas glucídicas, a nanopartículas aminadas (AMNP-CH-OPEr). Actividad lipasa determinada frente a *p*NPB.

Proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ soporte)	Ai (mU/mg soporte)	Rdto. Inmov. (%) <sup>a</sup>	Ae (mU/mg soporte)	Eficiencia (%) <sup>b</sup>	Actividad recuperada (%) <sup>c</sup>
<b>20</b>	<b>1500</b>	<b>96 <math>\pm</math> 3</b>	<b>707 <math>\pm</math> 19</b>	<b>49</b>	<b>47</b>
<b>50</b>	3750	61 $\pm$ 8	885 $\pm$ 8	38	24
<b>70</b>	5250	29 $\pm$ 0	895 $\pm$ 0	59	17

<sup>a</sup>Rendimiento inmovilización =  $100 \times (\text{Ar}/\text{Ai})$

<sup>b</sup>Eficiencia =  $100 \times (\text{Ae}/\text{Ai}-\text{Ar})$

<sup>c</sup>Actividad recuperada =  $100 \times (\text{Ae}/\text{Actividad inicial})$

Ai: actividad inicial ofrecida; Ar: actividad residual; Ae: actividad específica

Los nanobiocatalizadores con mayor actividad se obtuvieron en un rango de cargas de entre 20 y 70  $\mu\text{g}$  proteína/mg soporte, seleccionando 20  $\mu\text{g}$  proteína/mg soporte como valor óptimo. A cargas proteicas más altas el rendimiento de la inmovilización decae y la actividad específica del nanobiocatalizador se estanca, con un incremento de tan solo un 12%, indicando que los grupos reactivos del soporte magnético están ocupados. Comparando la actividad específica de los inmovilizados SiMAG-Octyl-OPEr (1.054 mU/mg) y AMNP-CH-OPEr (707 mU/mg), a esta carga proteica, vemos que la actividad específica del catalizador unido covalentemente es un 30% menor, y la actividad recuperada es también inferior. Sin embargo, apenas se detecta actividad en el sobrenadante en estas condiciones. Esto podría deberse a una cierta inactivación de OPEr durante el proceso, probablemente debida al pH alcalino, o a que las moléculas de OPEr inmovilizadas a través de la cadena glucídica próxima a la tapa (Figura 4.10 C) encuentren dificultades para pasar a su conformación abierta.

Tabla 4.7. Comparación de los principales parámetros de la inmovilización covalente de las lipasas mediante unión de aldehídos, generados en las cadenas glucídicas de las lipasas, a nanopartículas aminadas (AMNP-CH-). Actividad lipasa determinada frente a *p*NPB.

Lipasa	Ai (mU/mg soporte)	Rdto. Inmov. (%) <sup>a</sup>	Ae (mU/mg soporte)	Actividad recuperada (%) <sup>b</sup>
<b>OPeR</b>	<b>1500</b>	<b>96 ± 3</b>	<b>707 ± 19</b>	<b>47</b>
<b>Cal A<sup>®</sup></b>	1500	28 ± 0	417 ± 7	28
<b>Cal B<sup>®</sup></b>	1500	25 ± 2	127 ± 20	8
<b>Eversa<sup>®</sup></b>	1500	66 ± 0	756 ± 43	50
<sup>a</sup> Rendimiento inmovilización = 100 x (Ar/Ai)				
<sup>b</sup> Actividad recuperada = 100 x (Ae/Actividad inicial)				

Las lipasas comerciales también se inmovilizaron por este método a partir de una actividad inicial de 1.500 mU/mg soporte (Tabla 4.7). De nuevo, Eversa<sup>®</sup> y OPeR se comportaron de forma similar, y sus preparaciones mostraron valores semejantes de Ae y actividad recuperada, aunque el rendimiento de inmovilización de Eversa<sup>®</sup> fue menor. Como veremos posteriormente, la estabilidad de Eversa<sup>®</sup> a pH básico es superior a la de OPeR (Figura 4.13), y esto explica la buena correlación entre rendimiento de inmovilización y actividad recuperada para la enzima comercial y apunta a que OPeR sufre una inactivación parcial durante la inmovilización. Por otra parte, la Ae del preparado inmovilizado de Cal A<sup>®</sup> fue un 40% más baja que la de OPeR, y la de Cal B<sup>®</sup> un 80%.

#### 4.3.2.3. Inmovilización por precipitación y entrecruzamiento (mCLEAs)

En la mayor parte de la bibliografía consultada, las mCLEAs se producen simplemente por precipitación y entrecruzamiento en presencia del soporte recubierto y amino-funcionalizado (Cruz-Izquierdo *et al.*, 2014; Gricajeva *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2015; Netto *et al.*, 2013). En nuestro caso, los ensayos en los que se inmovilizó OPeR por este procedimiento carecían de actividad

en las reacciones de síntesis ensayadas, aunque sí fueron capaces de hidrolizar *p*NPB (datos no mostrados).

En una etapa tardía del desarrollo de esta Tesis encontramos en la bibliografía un protocolo diferente de preparación de mCLEAs, que comprendía una primera etapa de interacción del soporte activado AMNP-GA- con las proteínas a pH 8, seguida de la adición de sulfato amónico (precipitante de las proteínas que permanecen en solución) y de glutaraldehído, para la formación irreversible de agregados proteína-soporte (Kim *et al.*, 2010). En vista de la diferencia esencial que puede suponer la esa primera etapa en las propiedades del catalizador, decidimos ensayarlo para la inmovilización de OPEr. En las nuevas condiciones de inmovilización, la baja fuerza iónica del tampón y el corto tiempo de contacto entre las proteínas y los grupos aldehído pueden facilitar el establecimiento de interacciones iónicas rápidas entre el soporte y la proteína. Teniendo también en cuenta que esta reacción transcurre a un pH ligeramente alcalino, es posible que estos contactos proteína-soporte tampoco tengan lugar a través de los grupos  $\epsilon$ -amino de las cadenas laterales de las lisinas, que estarán poco o nada cargados. Sea cual sea la región por la que se produzca esta unión iónica, seguramente condicionará la orientación de una parte de las proteínas, la geometría, y la actividad del nanobiocatalizador final (Bernal *et al.*, 2018), obtenido tras inmovilizar irreversiblemente por precipitación y entrecruzamiento (Betancor *et al.*, 2006).

En este caso, y por razones de falta de tiempo, no se optimizó la carga proteica aportada para inmovilizar OPEr por este procedimiento, y se decidió mantener la misma dosis utilizada para producir las AMNP-GA-OPEr (10  $\mu$ g de proteína por mg de soporte), teniendo en cuenta la similitud del soporte. Comparado con AMNP-GA-OPEr, en el que el rendimiento de inmovilización fue del 65% a esta carga proteica (Tabla 4.4), en las mCLEAS-OPEr se inmovilizó el 99% de OPEr. A diferencia de los otros dos métodos de inmovilización covalente evaluados, las otras proteínas del crudo no compiten con OPEr por las posiciones

activas del soporte, una vez superada la primera fase de interacción. Además, se da el caso de que algunos protocolos de síntesis de CLEAs describen la incorporación de proteínas adicionales (*co-feeders*) como una herramienta para obtener preparaciones con mayor actividad (Tükel *et al.*, 2013). En este caso, la actividad recuperada en las mCLEAs (84%) casi duplica la determinada para AMNP-CH-OPeR (47%), pero la actividad específica de las mCLEAs-OPeR (769 mU/mg soporte) fue superior en un 10% y 2,3 veces mayor que la de AMNP-GA-OPeR para la misma carga proteica.

Algunas lipasas inmovilizadas con éxito como mCLEAs, mediante este u otros procedimientos similares, se han ensayado en diferentes tipos de reacciones (Cruz-Izquierdo *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2010; López *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017).

#### **4.3.3. Inmovilización covalente de OPeR sobre óxidos mixtos Zn/Mn**

Los soportes G1 y G4 se trataron según los procedimientos descritos en las secciones 3.8.2 y 3.8.3 para recubrirlos de una fina capa de silano y funcionalizarlos con grupos aldehído o amino, respectivamente. Para inmovilizar OPeR, se utilizó la misma carga proteica que para las AMNPs: 10 µg/mg de soporte AG1-GA o AG4-GA y 20 µg/ mg de soporte para AG1- o AG4-. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 4.8.

La combinación de los soportes AG1 y AG4 con la inmovilización por CH- rindió las dos preparaciones con mayor actividad específica de entre las sintetizadas covalentemente en esta Tesis, con un valor comparable al de SiMAG-Octyl-OPeR. Es especialmente interesante el resultado obtenido para AG4-CH-OPeR, para la que no se observa la inactivación parcial de OPeR al pH de la reacción, ya que el rendimiento de inmovilización y la actividad recuperada coinciden.

Tabla 4.8. Datos de la inmovilización covalente de OPEr sobre soportes de óxidos mixtos de Zn/Mn funcionalizados con grupos amino (AG1- y AG4-) y con grupos aldehído (AG1-GA- y AG4-GA-). Actividad lipasa determinada frente a *p*NPB.

Catalizador	Proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ soporte)	Ai (mU/mg soporte)	Rdto. Inmov. (%) <sup>a</sup>	Ae (mU/mg soporte)	Eficiencia (%) <sup>b</sup>	Actividad recuperada (%) <sup>c</sup>
AG1-CH-OPEr	20	1500	96 $\pm$ 3	896 $\pm$ 64	62	60
AG4-CH-OPEr	20	1500	68 $\pm$ 4	941 $\pm$ 155	92	63
AG1-GA-OPEr	10	750	43 $\pm$ 2	405 $\pm$ 89	126	54
AG4-GA-OPEr	10	750	32 $\pm$ 2	351 $\pm$ 100	146	47
<sup>a</sup> Rendimiento inmovilización = 100 x (Ar/Ai)						
<sup>b</sup> Eficiencia = 100 x (Ae/Ai-Ar)						
<sup>c</sup> Actividad recuperada = 100 x (Ae/Actividad inicial)						
Ai: actividad inicial ofrecida; Ar: actividad residual; Ae: actividad específica						

Estos dos soportes ejercen un efecto positivo sobre la actividad enzimática a pesar de que las partículas de óxido mixto están recubiertas y funcionalizadas, y más especialmente el soporte con base G4, el óxido mixto con mayor proporción de Zn (Tabla 4.2). Por otra parte, la inmovilización sobre AG1-GA y AG4-GA también ofrece resultados sorprendentes. El dato calculado para la eficiencia de inmovilización indica claramente que OPEr se hiperactiva, y de nuevo el efecto es superior con el soporte con base G4. Las causas de este efecto tendrán que estudiarse en profundidad.

No obstante, la manipulación de los catalizadores inmovilizados sobre este tipo de soportes resulta más complicada y menos adecuada que la de los soportes magnéticos, puesto que se recuperan por centrifugación. Una solución a este problema sería dotarlos de propiedades magnéticas mediante mezcla de los óxidos G1 y G4 con óxidos magnéticos.

#### 4.3.4. Comparación de los nanobiocatalizadores obtenidos

A modo de recopilación, compararemos las características de todos los catalizadores preparados y su actividad en hidrólisis del sustrato modelo *p*NPB. Los resultados obtenidos para los ocho nanobiocatalizadores que contienen la lipasa versátil OPEr,

que es el principal objetivo de la presente Tesis, se resumen en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Resumen de los resultados de la inmovilización de los nanobiocatalizadores de OPEr.

Nanobio-catalizador	Tipo de inmovilización	Ai (mU/mg soporte)	Rdto. Inmov. (%)	Ae (mU/mg soporte)	Eficiencia (%)	Actividad recuperada (%)
<b>AMNP-CH-OPEr</b>	Covalente	1500	98 ± 3	707 ± 19	57	54
<b>AG1-CH-OPEr</b>	Covalente	1500	96 ± 3	896 ± 64	62	68
<b>AG4-CH-OPEr</b>	Covalente	1500	68 ± 4	941 ± 155	92	68
<b>AMNP-GA-OPEr</b>	Covalente	750	65 ± 8	334 ± 5	69	45
<b>AG1-GA-OPEr</b>	Covalente	750	43 ± 2	405 ± 89	126	41
<b>AG4-GA-OPEr</b>	Covalente	750	32 ± 2	351 ± 100	146	68
<b>mCLEAS-OPEr</b>	Covalente	750	99 ± 2	769 ± 58	104	84
<b>SiMAG-Octyl-OPEr</b>	Hidrofobicidad	1050	99 ± 1	851 ± 69	82	65

Con los datos recogidos, y para la hidrólisis del sustrato modelo pNPB, podemos extraer varias conclusiones de estos datos:

a) Las inmovilizaciones más eficientes fueron las realizadas con los soportes AG1-GA y AG4-GA, puesto que la proteína incrementa su actividad. Aparte de éstas, son muy destacables las mCLEAs, por el excelente compromiso entre carga proteica, eficiencia de inmovilización, y actividad específica. Sería interesante optimizar las condiciones de inmovilización mediante este procedimiento para comprobar si incrementando la carga proteica se consigue un nanobiocatalizador con mayor actividad específica.

b) Las preparaciones más activas fueron la no covalente y las realizadas sobre los soportes AG1 y AG4 no activados con glutaraldehído, seguidas de cerca por mCLEAs y AMNPs.



c) La actividad específica de las preparaciones GA-OPeR fue entre 2 y 3 veces inferior a la determinada en los demás casos. Como ya se ha comentado, esto podría deberse a la presencia de proteínas distintas a la lipasa en los extractos crudos, que compiten con OPeR para ocupar los grupos aldehído disponibles en el soporte activado. Este hecho impacta en la actividad específica de los tres nanobiocatalizadores GA-OPeR.

d) En las condiciones utilizadas en este trabajo, los catalizadores producidos al unir OPeR a soportes activados con GA tienen menor actividad específica que los del tipo CH-OPeR.

El mejor de los procedimientos, si consideramos conjuntamente todos los parámetros de inmovilización evaluados, fue el de formación de mCLEAs de OPeR. Con una dosis baja de actividad inicial ofrecida y el 99% de inmovilización, se observó una excelente actividad en el inmovilizado.

Respecto a las lipasas comerciales, es difícil llegar a conclusiones válidas, ya que las condiciones de inmovilización no estaban optimizadas para cada una de ellas. Simplemente, señalaremos que mediante los dos procedimientos ensayados se obtiene proteína activa.

Estos resultados demuestran que el soporte y el método de inmovilización afectan a la actividad enzimática, y confirman la importancia de la ingeniería de biocatalizadores con el fin de seleccionar el más adecuado para una determinada aplicación (Cantone *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2007; Sheldon and van Pelt, 2013).

#### **4.3.5. Estabilidad de los nanobiocatalizadores**

Las enzimas destinadas a aplicaciones biotecnológicas soportan, en muchos casos, condiciones de reacción mucho más drásticas que las de su entorno natural. Cuando se habla de la estabilidad de una enzima, nos referimos al mantenimiento de su actividad catalítica, ya sea en un determinado rango de temperatura o pH, en presencia de compuestos como iones o disolventes orgánicos, o durante su almacenamiento. Durante el



proceso de inmovilización, la estabilidad de una enzima puede aumentar, disminuir o permanecer inalterada. Varios factores pueden afectar a la estabilidad de un catalizador inmovilizado y, entre ellos, los más relevantes están relacionados con factores como el microambiente (hidrofilia, pH, fuerza iónica...), el confinamiento de la proteína en determinados soportes (tamaño de poro, etc.), la conformación y orientación de la proteína inmovilizada, así como la carga enzimática, el tipo de portador y la naturaleza de su unión a la proteína. Por ello, es interesante estudiar su estabilidad frente a parámetros como el pH y la temperatura durante periodos de tiempo equivalentes a los de las reacciones que se pretende catalizar, así como durante periodos prolongados de almacenamiento.

#### **4.3.5.1. Estabilidad a temperatura**

La temperatura óptima de las lipasas suele ser de entre 30-60 °C y 60-80 °C según provengan de microorganismos mesófilos o termófilos (Royter *et al.*, 2009). Aunque durante la puesta a punto de un proceso biotecnológico medioambientalmente sostenible se intenta que la temperatura de trabajo sea lo más baja posible, en muchas ocasiones ésta debe ser necesariamente elevada para que la reacción se complete en un tiempo razonable, y la enzima debe soportarla (Christopher *et al.*, 2014; Sheldon and Woodley, 2018). En el caso de las lipasas, el rango operativo se extiende, de forma general, entre los 20-70 °C, siendo las lipasas bacterianas habitualmente más termoestables que las procedentes de otras fuentes (Christopher *et al.*, 2014).

Los datos obtenidos para la lipasa OPEr y sus diferentes formas inmovilizadas se muestran en la Figura 4.11. La enzima libre experimentó una fuerte disminución de la actividad con el aumento de la temperatura por encima de los 30 °C, conservando sólo el 9% a 50 °C.

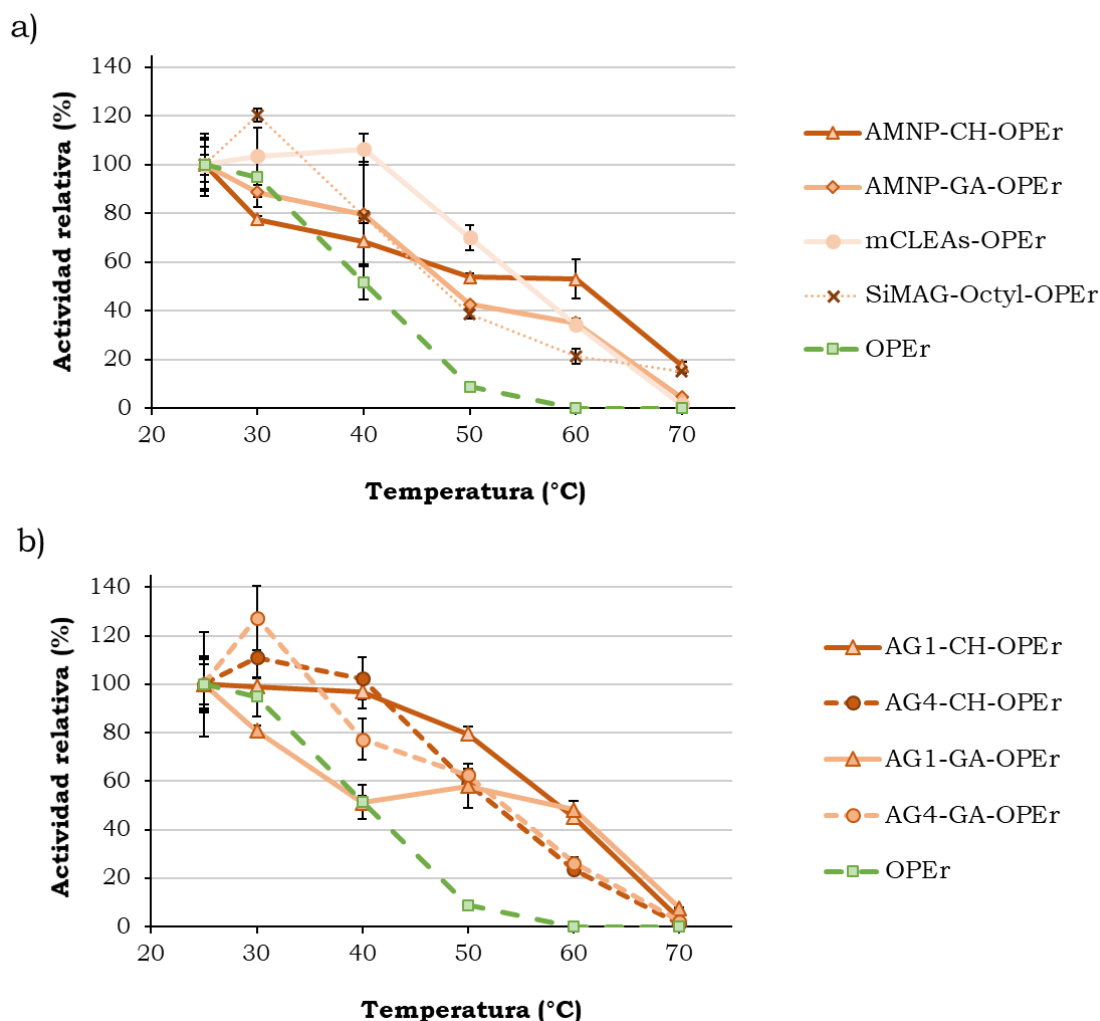


Figura 4.11. Termoestabilidad de los nanobiocatalizadores de OPER *vs.* OPER soluble: a) magnéticos; b) no magnéticos.

En general, los nanobiocatalizadores de OPER mostraron mayor o igual estabilidad que la enzima libre a lo largo del rango de temperatura analizado. Curiosamente, algunas de las preparaciones mostraron una actividad inferior a la de OPER libre a 30 °C, mientras que en otras (SiMAG-Octyl-OPER y las dos preparaciones con soporte G4) es ligeramente superior. A 50 y 60 °C la actividad residual de cualquiera de las preparaciones inmovilizadas es netamente superior, y a 70 °C dos de los nanobiocatalizadores, AMNP-CH-OPER y SiMAG-Octyl-OPER, conservan el 15% de la actividad inicial. El hecho de que la enzima inmovilizada por interacción hidrofóbica mantenga

actividad a 70 °C es notable, ya que es frecuente que las enzimas se desorban totalmente a esta temperatura (Rodrigues *et al.*, 2019).

También se estudió el perfil de estabilidad térmica de algunas de las preparaciones de enzimas comerciales (AMNP-CH-Cal A, AMNP-CH-Cal B, AMNP-CH-Eversa y AMNP-GA-Eversa) frente a sus formas no inmovilizadas (Figura 4.12). Los nanobiocatalizadores de Cal A<sup>®</sup> y Eversa<sup>®</sup> mostraron perfiles bastante similares a los de la respectiva enzima libre, sin mejoras significativas debida a la inmovilización, excepto un cierto incremento de su estabilidad a 70 °C. Probablemente, la estabilidad térmica de estas enzimas ha sido ya mejorada antes de su comercialización por las compañías que las producen. Ondul *et al.* (2012) describieron un fenómeno similar cuando inmovilizaron mediante entrecruzamiento la lipasa de *T. lanuginosus* y Cal A<sup>®</sup>, que solo mejoró su estabilidad a 70-80 °C tras la inmovilización.

Por el contrario, la inmovilización de Cal B<sup>®</sup> evidenció una gran mejora de estabilidad a 50 °C (80% de actividad residual) frente a la enzima libre, que se inactiva a esta temperatura, y también mantuvo cierta actividad a 60 °C y 70 °C. Arroyo *et al.* (1999) comprobaron la mejora de estabilidad de Cal B<sup>®</sup> inmovilizada covalentemente, sobre distintos soportes orgánicos, tras 25 h a 50 °C. Estos catalizadores mantuvieron entre un 25-55% de su actividad inicial mientras que la enzima libre perdió su actividad pasadas 2 h.

Muchos trabajos, como el que acabamos de citar, abordan el estudio de la estabilidad a una temperatura concreta de lipasas inmovilizadas, y no en un rango amplio de temperaturas. Sin embargo, estudiando el rango de temperatura que soportan estos nanobiocatalizadores podemos buscar nuevas aplicaciones, o mejores condiciones para su uso. Romero *et al.* (2018) inmovilizaron la lipasa de *C. rugosa* sobre nanopartículas magnéticas de Mg funcionalizadas con GA, incrementando su estabilidad un 30-35% entre 10-40 °C y un 20% a 50 °C.

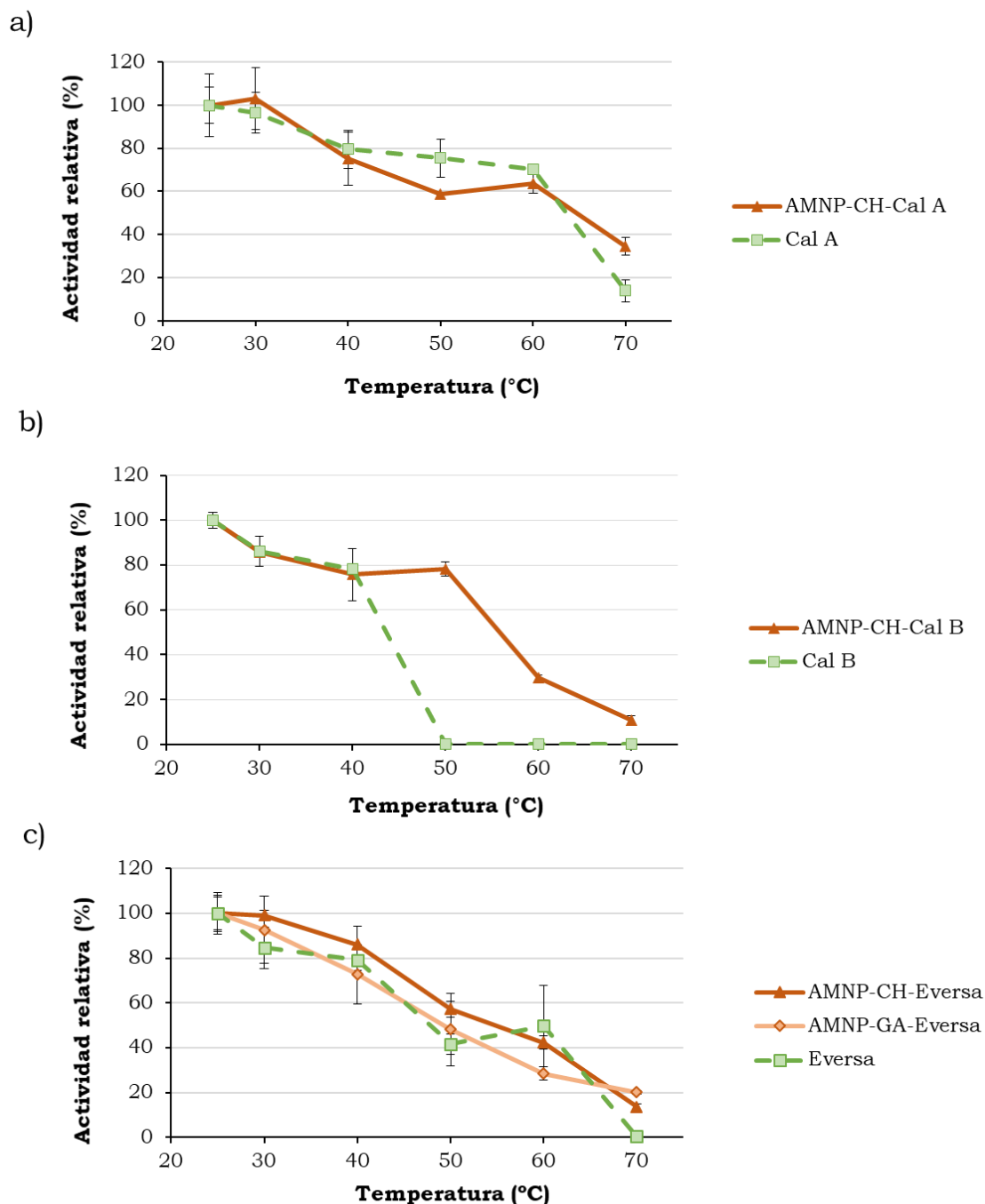


Figura 4.12. Comparación de la termoestabilidad de enzimas solubles *vs.* Nanobiocatalizadores: a) Cal A® y AMNP-CH-Cal A; b) Cal B® y AMNP-CH-Cal B; c) Eversa®, AMNP-CH-Eversa y AMNP-GA-Eversa.

Kim *et al.* (2010) inmovilizaron también esta enzima como mCLEAs, mediante el mismo protocolo empleado en esta Tesis, consiguiendo una ligera mejora entre 10-40 °C, mucho menor que la observada para OPEr en nuestro estudio, aunque entre

50-60 °C la mejora en la estabilidad fue similar a la obtenida para las mCLEAs-OPeR. En el caso de la lipasa de *G. candidum* inmovilizada, de forma no covalente, sobre el soporte MANAE-Agarosa, el perfil de estabilidad térmica mejoró a las temperaturas más altas, entre 40-80 °C, llegando a tener más de un 60% de actividad a 70 °C, mientras que su forma libre mantuvo solo un 20% de su actividad inicial (Ferreira *et al.*, 2018). Sin embargo, hay que hacer notar que en este ensayo los catalizadores se mantuvieron solo 1 hora en las condiciones ensayadas.

Por tanto, podemos concluir que, aunque la mejora en la estabilidad térmica no fue tan evidente para Eversa® y Cal A®, todos los métodos de inmovilización mejoraron, en mayor o menor medida, la estabilidad térmica de las lipasas evaluadas, aunque existen diferencias entre cada uno. Esta mejora de la estabilidad térmica se debe, probablemente, a cambios conformacionales inducidos en la estructura 3D de las enzimas cuando se inmovilizan (Arroyo *et al.*, 1999).

#### **4.3.5.2. Estabilidad a pH de los nanobiocatalizadores**

Las diferencias entre las lipasas libres e inmovilizadas fueron más relevantes cuando se estudió la estabilidad a pH en el rango 2-10 durante 24 h. La actividad medida a pH 7 y 25 °C para cada catalizador fue tomada como el 100%.

Comenzando por OPeR, la inmovilización, por cualquiera de los procedimientos empleados en este trabajo, mejoró el perfil de estabilidad de la enzima libre a diferentes valores de pH (Figura 4.13).

En general, la estabilidad fue excepcional al someter la enzima a valores extremos de pH ácido. A pH 2, solo SiMAG-Octyl-OPeR perdió completamente su actividad, al igual que la enzima nativa, mientras que el resto de los nanobiocatalizadores (magnéticos o no) mantuvieron más del 50% de actividad a ese pH. A pH 10 todos ellos conservaron entre el 40% y el 80% de la actividad.

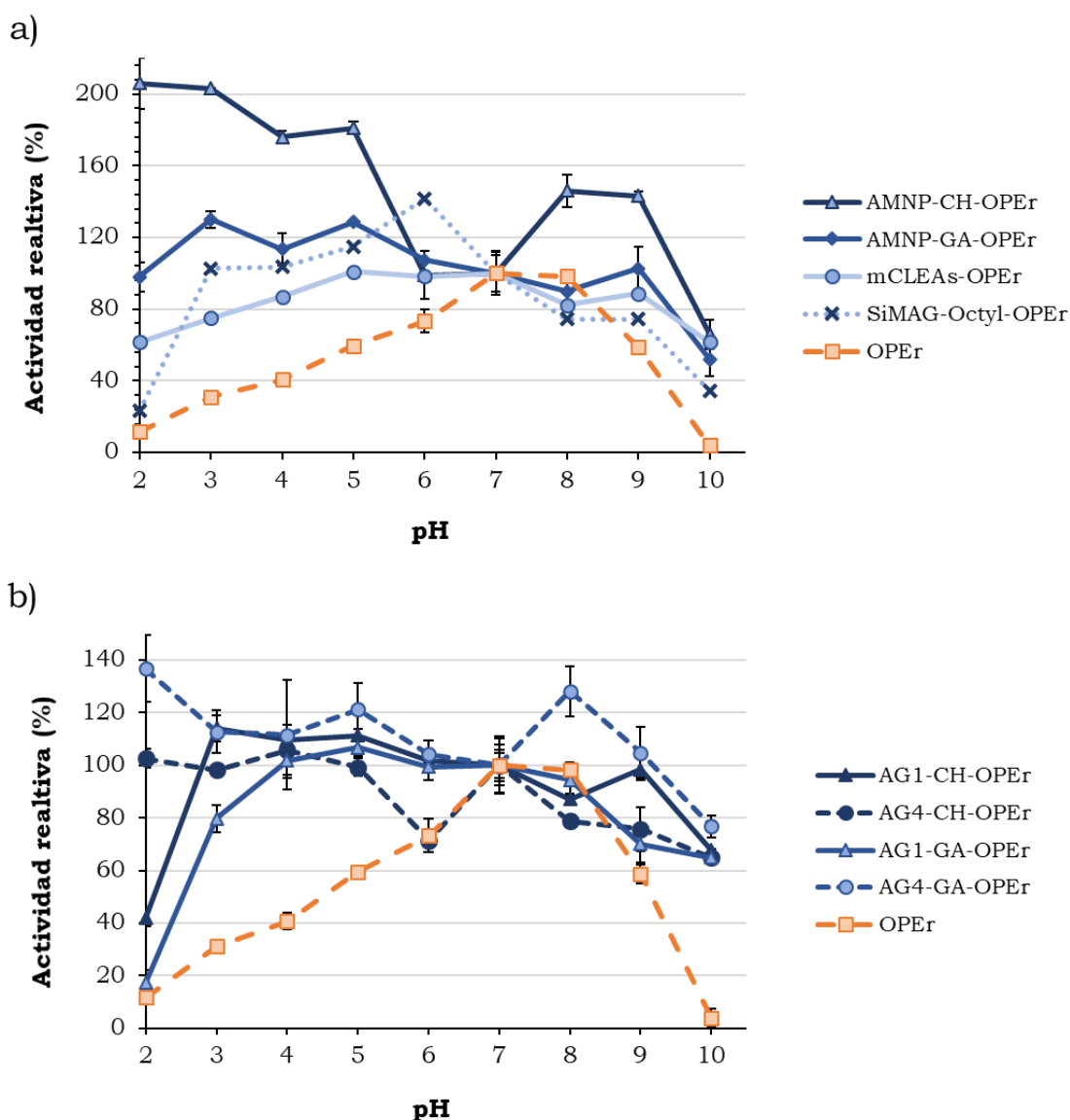


Figura 4.13. Estabilidad a pH de los nanobiocatalizadores de OPer *vs.* OPer soluble: a) magnéticos; b) no magnéticos.

La actividad detectada para AMNP-CH-OPeR fue muy superior al 100% a valores de pH ácidos o alcalinos. Esto sugiere que, en medio acuoso, este nanobiocatalizador se hiperactiva a valores de pH inferiores a 6 y entre 8-9. Este comportamiento ha sido descrito también para Cal A<sup>®</sup> inmovilizada sobre MNPs recubiertas con quitosano y activadas con GA (Monteiro *et al.*, 2019), aunque como veremos más adelante, nuestro nanobiocatalizador de Cal A<sup>®</sup> no experimentó este efecto de

activación. La enzima inmovilizada por -CH sobre los soportes de óxidos de Zn/Mn también mostró una actividad superior a la inicial a pHs entre 3-7. A pH 2 hay una gran diferencia entre el soporte AG1 y el AG4, manteniendo este último toda su actividad inicial. Sin superar el 100%, su estabilidad a pH 8-10 es también muy elevada (60-100%). Los perfiles de pH de mCLEAs-OPeR y SiMAG-Octyl-OPeR fueron los menos optimizados y muy similares entre sí a pHs básicos, a pH s ácidos SiMAG-Octyl-OPeR mantuvo una mayor actividad excepto a pH 2.

En cuanto a las enzimas comerciales, no se observaron mejoras tras la inmovilización excepto en el caso de Cal A<sup>®</sup>, cuya estabilidad a valores de pH entre 3-5 fue muy superior a la de la enzima libre (Figura 4.14). Cal B<sup>®</sup> y Eversa<sup>®</sup> mantuvieron la misma actividad antes y después de la inmovilización, e incluso sorprende que a pH 9-10 las enzimas solubles fueran más activas.

El incremento de la estabilidad a pH ácido también fue observado por Wang *et al.* (2015) tras la inmovilización de la lipasa de *C. rugosa* sobre soportes funcionalizados con grupos aldehído o amino mediante interacción iónica. En cuanto a la inmovilización por precipitación y entrecruzamiento, el trabajo de Kim *et al.* (2010) describe una mejora de entre un 10-20% en el rango evaluado (pH 4-9), inferior a la determinada en esta Tesis para las mCLEAs-OPeR. Eversa<sup>®</sup> fue inmovilizada mediante interacción hidrofóbica por Arana-Peña *et al.* (2018) sobre perlas de agarosa con grupos octilo, mejorando su estabilidad a pHs entre 4-6. El efecto positivo de la inmovilización sobre la estabilidad de las lipasas ha sido ampliamente reportado, y generalmente se atribuye a la rigidez de la estructura de la proteína después de la fijación, en el caso de que la unión sea covalente, o a la generación de ambientes favorables (Mehrasbi *et al.*, 2017; Miao *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2014).

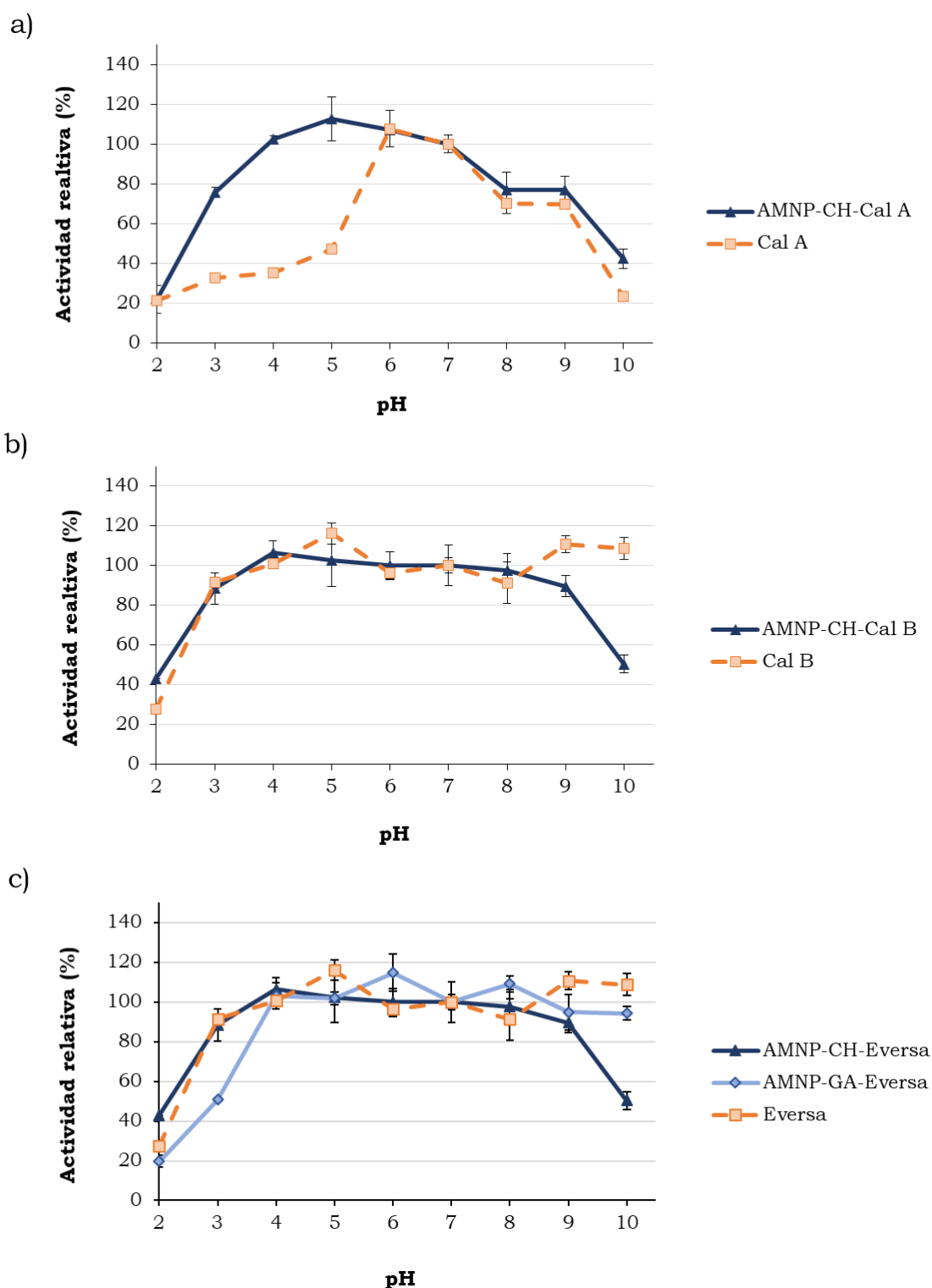


Figura 4.14. Estabilidad a pH de la enzima soluble *vs.* los nanobiocatalizadores: a) Cal A® y AMNP-CH-Cal A; b) Cal B® y AMNP-CH-Cal B; c) Eversa®, AMNP-CH-Eversa y AMNP-GA-Eversa.



#### 4.3.5.3. Estabilidad almacenamiento

En la economía de un bioproceso las enzimas representan más de la mitad del coste de producción. Por tanto, la posibilidad de almacenarlas a largo plazo sin pérdida de su actividad biológica resulta muy interesante (Kim *et al.*, 2010).

En esta Tesis se evaluó la actividad de todos los nanobiocatalizadores durante 6-8 meses de almacenamiento a 4 °C, en Tris-HCl 20 mM, pH 7, sin adición de estabilizantes. Los datos de la Figura 4.15 muestran los resultados de la actividad residual al cabo de 8 meses para los nanobiocatalizadores magnéticos de OPEr y de 6 meses para los no magnéticos. Con todos los nanobiocatalizadores que implicaban la unión de la proteína a través de las cadenas glucídicas modificadas (CH-OPEr) se obtuvieron excelentes resultados, independientemente del soporte utilizado: 100% de su actividad inicial con AMNPs y AG1 y 80% sobre AG4. En cuanto a los nanobiocatalizadores que implican el uso de soportes funcionalizados con glutaraldehído, ya sea mediante unión covalente o como mCLEAs, la actividad residual de AMNP-GA-OPEr estuvo en torno a 50-60% (tras 8 meses) y la de AG1-GA y AG4-GA entre el 80-100% (tras 6 meses). En el caso de las mCLEAs-OPEr cabe destacar que esa pérdida de actividad ya se produce a los 30 días y a partir de ahí se mantienen estables con una actividad residual del 60%. Con AMNP-GA-OPEr la mayor pérdida de actividad se dio al cabo de 3 meses (en torno a un 60% de actividad residual) y disminuyó un 10% en los 5 meses siguientes. El nanobiocatalizador obtenido mediante inmovilización no covalente es el que mostró mayor pérdida de actividad, con menos de un 40% de actividad residual a los 8 meses, sin embargo, esta pérdida ya se observó al segundo mes de almacenamiento (datos no mostrados). Dado que se descartó el lixiviado de la enzima, ya que no se detectó ni actividad lipasa ni proteínas en el buffer de almacenamiento, la disminución de actividad podría deberse a la inactivación de la lipasa.

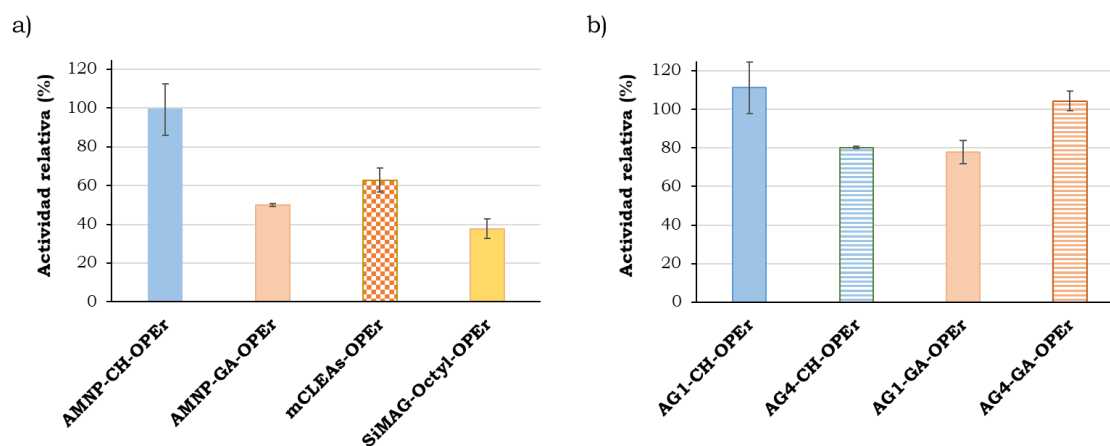


Figura 4.15. Estabilidad almacenamiento OPER. a) Nanobiocatalizadores con soporte magnético, actividad residual al cabo de 8 meses. b) Nanobiocatalizadores con soporte no magnético, actividad residual al cabo de 6 meses.

En general, la estabilidad de las enzimas comerciales inmovilizadas (Figura 4.16) sobre partículas magnéticas se mantuvo entre el 60-80% de su actividad inicial. Cabe destacar de entre estos nanobiocatalizadores que AMNP-GA-Cal A mantuvo cerca del 100% de actividad. Los nanobiocatalizadores de Cal A<sup>®</sup> y Cal B<sup>®</sup> conservaron entre un 83-95% de actividad a los 6 meses, y Eversa<sup>®</sup> en torno al 75% de actividad residual.

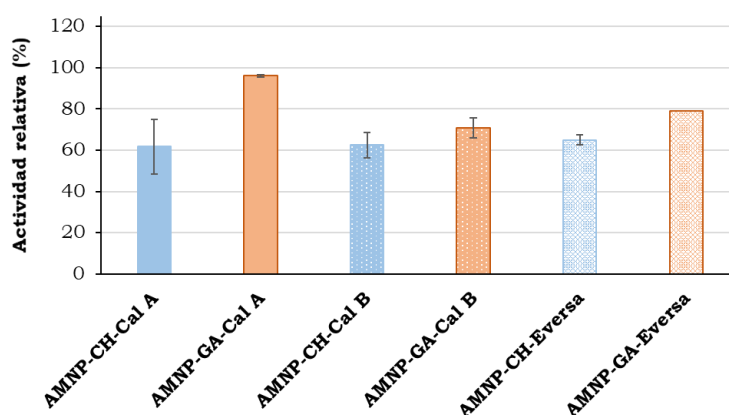


Figura 4.16. Estabilidad almacenamiento de los nanobiocatalizadores comerciales, actividad residual al cabo de 8 meses.

Son escasos los estudios con lipasas inmovilizadas que analizan su estabilidad de almacenamiento, más aún a tan largo plazo, como el que se presenta en esta Tesis (Bilal *et al.*, 2018). El estudio realizado por Kim *et al.* (2010) indica que las mCLEAs de la lipasa de *C. rugosa* mantuvieron el 82% de su actividad inicial, pero los datos solo se analizaron hasta 30 días. También inmovilizada como mCLEAs, la lipasa de *Candida* sp. no perdió actividad después de 28 días (Cui *et al.*, 2016) y retuvo entre un 54-75%, tras 38 días de almacenamiento a 4 y 25 °C. Si comparamos estos datos con los determinados para las mCLEAs-OPeR, vemos que la actividad residual al cabo de 8 meses de almacenamiento es muy buena. En otro trabajo, Cal A® inmovilizada covalentemente conservó el 60% de actividad tras 28 días (Ondul *et al.*, 2012). Tras 120 días a 4 °C la lipasa de *T. lanuginosus* inmovilizada por interacción iónica sobre MNPs mantuvo el 64% de su actividad (Sarno *et al.*, 2017).

Con estos datos podemos decir que los nanobiocatalizadores sintetizados en este trabajo tuvieron una buena estabilidad de almacenamiento, principalmente los que se sintetizaron sobre los soportes no magnéticos y AMNP-CH-OPeR.

#### **4.3.5.4. Visualización mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido de los nanobiocatalizadores**

A continuación, describiremos la morfología de los nanobiocatalizadores sintetizados, que se analizó mediante microscopía electrónica. En primer lugar, es importante recordar que la alta energía superficial de las MNPs, debida a su gran superficie específica, hace que éstas tiendan a agregar (Bilal *et al.*, 2018). La adición de una capa de sílice con grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas de magnetita puede impedir su agregación en líquidos y mejorar su estabilidad química, así como su biocompatibilidad. La superficie hidrofílica de las nanopartículas silanizadas también puede ayudar a la unión de las enzimas en solución acuosa (Netto *et al.*, 2013). A pesar de todo esto, se observó un alto estado de agregación en

todos los nanobiocatalizadores, quizá debido al procesamiento de las muestras o a una silanización desigual de las nanopartículas que favorezca su agregación (Figura 4.17).

Las imágenes de TEM y SEM de SiMAG-Octyl-OPeR muestran el recubrimiento ya observado en el soporte (Figura 4.2 b), aunque en este caso es de mayor grosor (aproximadamente 5 nm, indicado con flechas rojas). Las imágenes de TEM de los otros catalizadores magnéticos (Figura 4.17 a, arriba) no permitieron detectar diferencias claras con las del correspondiente soporte sin enzima, excepto las mCLEAs-OPeR, en las que se observa una fina capa de la enzima (señalada con flechas rojas).

En las imágenes de SEM (Figura 4.17 a, abajo) sí que se aprecia la diferencia entre el aspecto de AMNP-CH-OPeR y AMNP-GA-OPeR. El de las primeras es más semejante al del soporte desnudo, con partículas más discretas, mientras que el segundo, a pesar de que se percibe la silueta individual, se observan aglomerados. A pesar de ello, en general no se observan cambios en el tamaño medio de las preparaciones con OPeR inmovilizada con respecto a su soporte (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Diámetro medio de los nanobiocatalizadores observado por TEM.

Nanobiocatalizador	Diámetro medio (nm)
<b>MNPs</b>	$10 \pm 3$
<b>AMNP-CH-OPeR</b>	$9 \pm 2$
<b>AMNP-GA-OPeR</b>	$8 \pm 3$
<b>mCLEAs-OPeR</b>	$8 \pm 2$
<b>SiMAG-Octyl</b>	$10 \pm 2$
<b>SiMAG-Octyl-OPeR</b>	$11 \pm 4$

Como en el caso de sus soportes, con los nanobiocatalizadores no magnéticos, no es posible realizar una distribución de tamaños debido la heterogeneidad morfológica de la muestra. En las imágenes de TEM no se observan señales del recubrimiento de sílice o la enzima (Figura 4.17 b).

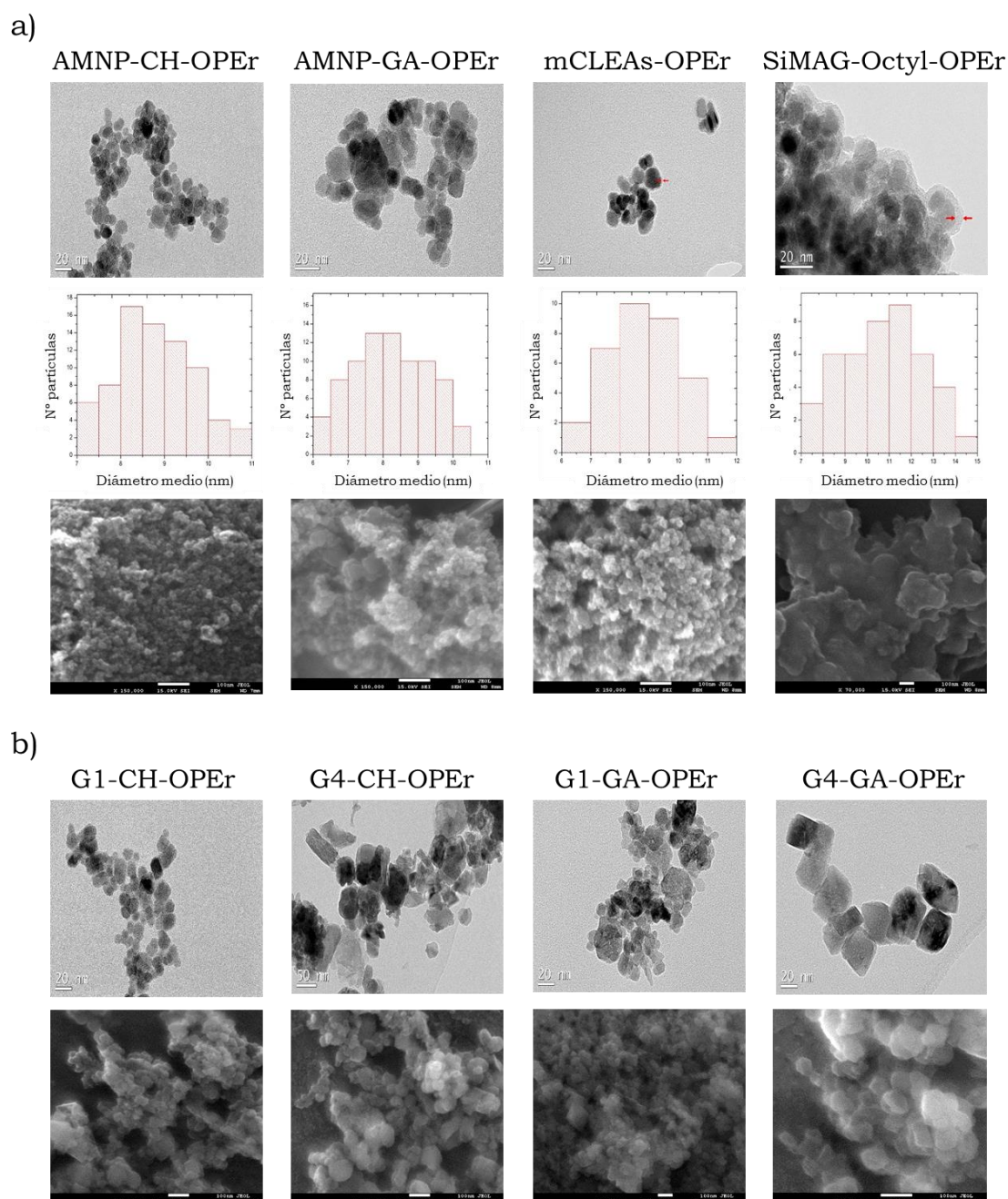


Figura 4.17. Micrografías de TEM (arriba), distribución de tamaño (centro) y micrografías de SEM (abajo) de las preparaciones con OPER inmovilizada sobre soportes: a) magnéticos y b) no magnéticos.

#### 4.3.6. Microscopía confocal láser de barrido

Los azúcares de la lipasa OPEr se utilizaron como herramientas para la localización de la glicoproteína en la superficie del soporte. Muestras del soporte sin lipasa y de los nanobiocatalizadores con OPEr fueron tratadas con Concanavalina A, conjugada con Alexa Flúor 594, y observadas por microscopía láser confocal. Esta lectina se une específicamente a las unidades de  $\alpha$ -manopiranosas (o glucopiranosas) de las cadenas glucídicas, y al llevar un fluoróforo acoplado, emite fluorescencia roja cuando se excita con una longitud de onda láser apropiada.

En una primera aproximación, observamos fluorescencia en las muestras en las que sólo había soporte (sin enzima), lo que indicaba que la lectina se había unido inespecíficamente al mismo. Para bloquear los sitios activos responsables de esta interacción, se preincubaron las preparaciones con BSA y Tween 20, de modo que la lectina se unió específicamente a la muestra con proteína inmovilizada. Esto se observó como un aumento significativo de la fluorescencia roja en las muestras con lipasa inmovilizada sobre soportes magnéticos, con los puntos de fluorescencia co-localizándose con la imagen del material observado bajo la luz del microscopio (Figura 3.18). Sin embargo, en los soportes compuestos por Zn/Mn no se consiguió evitar esta unión inespecífica y por tanto los resultados no fueron concluyentes.

En las imágenes (Figura 4.18) se observan grandes agregados de MNPs (soporte), y que las glicoproteínas no se reparten en su superficie de manera homogénea, a excepción de en SiMAG-Octyl-OPEr. La formación de estos agregados, que ya se visualizaron mediante TEM/SEM (Figura 4.17 a), puede impedir que la funcionalización realizada en el laboratorio sea homogénea, y, por tanto, la distribución uniforme de la enzima. Además, estos agregados pueden romperse durante la



inmovilización, dejando expuestas zonas superficiales de las MNPs que no estén funcionalizadas.

Cui *et al.* (2016) analizaron mCLEAs de la lipasa de *Candida* sp. mediante microscopía confocal de barrido y, en este caso, la microscopía electrónica permitió ver en mayor detalle la estructura del nanobiocatalizador y la distribución de la enzima, que tampoco fue homogénea. También se ha observado la distribución de lipasas inmovilizadas sobre otros soportes como pueden ser Dilbeads (Torres-Salas *et al.*, 2011a) o nanotubos de SnO<sub>2</sub> (Anwar *et al.*, 2017), y en ambos la enzima se repartía más uniformemente sobre su superficie. Sin embargo, en todos estos casos la lipasa fue marcada previamente a la inmovilización con isotiocianato de fluoresceína, para poder ser detectada, lo que podría estar influyendo en distintos parámetros de la inmovilización, aunque evita la unión inespecífica del marcaje al soporte que puede interferir en la técnica. En el caso de OPEn inmovilizada, la lipasa fue marcada con la lectina una vez inmovilizada, no interfiriendo de esta manera en el proceso de inmovilización.

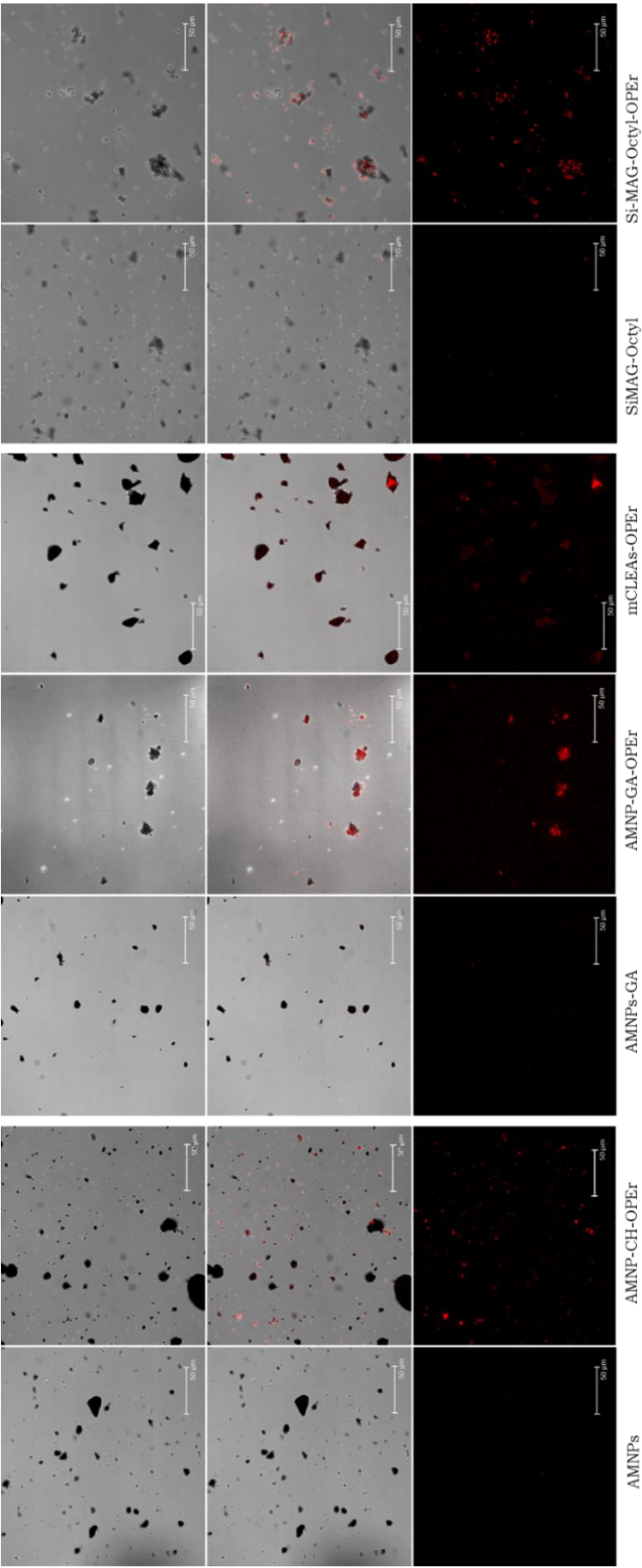


Figura 4.18. Micrografías de microscopía confocal láser de barrido (x63). Arriba: nanobiototalizadores de la muestra sin excitar; centro: superposición de la imagen de los nanobiototalizadores y la imagen de la señal fluorescente que indica la presencia de la enzima; abajo: señal de la fluorescencia de la enzima sobre los nanobiototalizadores





#### 4.3.7. Citotoxicidad

La utilización de nanomateriales en algunas aplicaciones se ve limitada en la actualidad por las incertidumbres que persisten en cuanto a las consecuencias de su uso (Dubascoux and Wyser, 2019). En este trabajo se han empleado nanomateriales como soportes para inmovilizar las enzimas, y el catalizador final puede destinarse a la síntesis de compuestos para consumo humano. Este es el caso de dos de las aplicaciones descritas en esta Tesis, la síntesis de ésteres de sitoestanol y de ácidos grasos de cadena corta (VFA), productos de uso alimentario o cosmético. Por ello, es importante comprobar que no se liberan sustancias nocivas al medio de reacción procedentes del propio soporte, de los reactivos empleados en la inmovilización, o del catalizador final.

Se prepararon suspensiones de cada nanobiocatalizador en tampón, a concentraciones superiores a las utilizadas en los experimentos, para evaluar su potencial toxicidad. Los sobrenadantes se recuperaron y se prepararon diluciones seriadas, con las que se trataron cultivos de líneas celulares HeLa y A549, comprobando su efecto sobre la viabilidad celular. Los resultados fueron comparados con los obtenidos en células no tratadas (control negativo) y tratadas con colchicina (control positivo), un compuesto que despolimeriza los microtúbulos y bloquea la formación del huso mitótico (Buey *et al.*, 2005). Como se muestra en la Tabla 4.11, la exposición a bajas concentraciones de colchicina afecta fuertemente la viabilidad celular, mientras que ninguno de los sobrenadantes produjo efectos citotóxicos sobre las líneas celulares a ninguna de las concentraciones ensayadas, tras 48 h de incubación. Por lo tanto, podemos afirmar que, a las concentraciones máximas de nanobiocatalizadores ensayadas, el empleo de éstos es seguro, ya que no se liberan compuestos citotóxicos.

Tabla 4.11. Valores de  $IC_{50}$  de los sobrenadantes de suspensiones de los nanobiocatalizadores, ensayados sobre dos líneas celulares. Se indican las cantidades de nanobiocatalizador empleadas en las reacciones de síntesis de ésteres de sitoestanol y de ácidos grasos volátiles, compuestos con aplicación en la industria alimentaria o cosmética.

<b>Extracto/Compuesto</b>	<b><math>IC_{50}</math> HeLa</b>	<b><math>IC_{50}</math> A549</b>	<b>[Catalizador] esterificación VFAs</b>	<b>[Catalizador] transesterificación <math>\beta</math>- sitoestanol</b>
Colchicina	63,2 $\pm$ 9,4 nM	93,0 $\pm$ 5,7 nM	--	--
AMNPs-CH-OPeR	> 140 mg/mL	> 140 mg/mL	27 mg/mL	86 mg/mL
AG1-CH-OPeR	> 140 mg/mL	> 140 mg/mL	25 mg/mL	78 mg/mL
AG4-CH-OPeR	> 140 mg/mL	> 140 mg/mL	24 mg/mL	74 mg/mL
AMNPs-GA-OPeR	> 250 mg/mL	> 250 mg/mL	64 mg/mL	204 mg/mL
AG1-GA-OPeR	> 250 mg/mL	> 250 mg/mL	54 mg/mL	173 mg/mL
AG4-GA-OPeR	> 250 mg/mL	> 250 mg/mL	63 mg/mL	199 mg/mL
mCLEAs-OPeR	> 140 mg/mL	> 140 mg/mL	29 mg/mL	91 mg/mL
SiMAG-Octyl-OPeR	> 140 mg/mL	> 140 mg/mL	26 mg/mL	82 mg/mL

La Figura 4.19 muestra las micrografías de las células tratadas con el extracto de AMNP-CH-OPeR a la concentración máxima evaluada, junto con un control positivo (células tratadas con colchicina a la máxima concentración ensayada) y uno negativo (células sin tratar). Las imágenes del análisis del efecto de los otros tratamientos con los demás nanobiocatalizadores son comparables (datos no mostrados). Así, la observación microscópica de las células respalda los resultados de la  $IC_{50}$ . No se aprecian diferencias entre las células control no tratadas y las tratadas durante 48 h con los extractos (a la máxima concentración), mientras que, en el control positivo, expuesto al agente citotóxico colchicina, se observan pocas células y la mayor parte de ellas no están adheridas al pocillo, lo que es un signo de citotoxicidad.

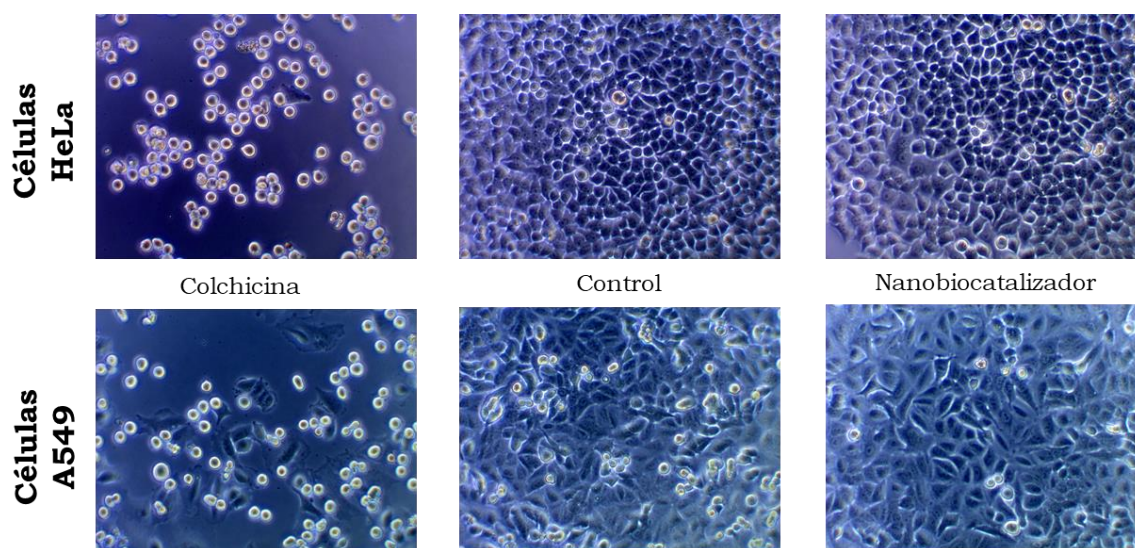


Figura 4.19. Micrografías de células HeLa y A549 no tratadas (centro) y tratadas durante 48 h con la máxima concentración ensayada de colchicina (izquierda) y extracto de AMNP-CH-OPeR (derecha).

Hasta ahora, no se ha descrito en bibliografía un estudio de este tipo. Sí se han ensayado las propiedades citotóxicas de distintas nanopartículas directamente sobre las células, ya que estas se pueden usar en tratamientos tumorales por sí mismas

o portando distintas moléculas (Alonso-Cristobal *et al.*, 2015; Amiri *et al.*, 2018; Braun *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2011; Laurent *et al.*, 2012), pero no así la transferencia al medio de reacción de compuestos tóxicos en biocatálisis.

#### **4.4. Síntesis enzimática de aromas y saborizantes**

Algunos ésteres de ácidos grasos de cadena corta, también denominados ácidos grasos volátiles (VFA) se utilizan ampliamente como saborizantes y fragancias. Como ya se ha comentado, sus características sensoriales varían en función de la longitud de la cadena del ácido y el alcohol que los hayan originado.

En esta Tesis, se abordó la síntesis enzimática de ésteres butílicos de ácidos grasos de cadena corta de entre 4 y 7 átomos de C (C4-C7) mediante esterificación directa. Estas reacciones constituyen un modelo simple, pero biotecnológicamente interesante, para evaluar la actividad sintética de los nanobiocatalizadores. Por otra parte, también permiten estimar el efecto de la longitud de cadena del ácido sobre la eficiencia enzimática.

Las reacciones se realizaron en presencia de un solvente orgánico y, en estas condiciones, el equilibrio termodinámico favorece la síntesis sobre la hidrólisis. Se eligió isooctano como cosolvente, por ser un disolvente apolar (log P 4,5) previamente utilizado en nuestro laboratorio en reacciones de síntesis por esterificación directa. Con este disolvente se obtuvieron mejores porcentajes de conversión en dicha reacción que utilizando hexano (log P 3,5) y tolueno (log P 2,5) (Barba *et al.*, 2011), lo que puede deberse a que es más apolar, contribuyendo en mayor medida a mantener la lipasa en su conformación abierta (Kumar *et al.*, 2016).

El ensayo estándar se realizó a 25 °C, con una proporción molar ácido:butanol de 1:2 y el sustrato ácido a una concentración de 100 mM. Esta relación ácido:alcohol se eligió

inicialmente porque ha demostrado producir buenos rendimientos en la síntesis enzimática de ésteres cosméticos (Khan and Rathod, 2015). Además, hay que tener en cuenta que en las reacciones de esterificación directa se liberan, como productos de reacción, cantidades equimolares de agua y del éster sintetizado. Dado que la reacción es reversible, la acumulación de agua en el medio podría desplazar el equilibrio hacia la hidrólisis, destruyendo parte de los ésteres sintetizados. En general, el empleo de un exceso molar de uno de los sustratos es otro de los factores que desplaza el equilibrio termodinámico hacia la síntesis (Monteiro *et al.*, 2019).

#### **4.4.1. Esterificación directa catalizada por OPEr**

En las condiciones descritas, todos los nanobiocatalizadores de OPEr fueron capaces de producir ésteres a niveles más o menos similares a los de la enzima libre, con rendimientos, que generalmente, oscilaron entre el 75% y el 100% al tiempo final de reacción. Las reacciones más eficientes estuvieron catalizadas por la enzima libre, AMNP-CH-OPEr y AMNP-GA-OPEr, con rendimientos de esterificación cercanos al 100% en 6 h (Figura 4.20). Analizando los datos recogidos durante el transcurso de la esterificación, se pueden observar distintos patrones en función del tamaño de cadena de los ácidos (Tabla 4.12).

La velocidad inicial aumenta con la longitud de cadena en reacciones catalizadas por OPEr o sus formas inmovilizadas menos rígidas, que serían SiMAG-Octyl-OPEr, AMNP-CH-OPEr y AG1-CH-OPEr. Este comportamiento se ha descrito para las lipasas comerciales Novozym 435, Lipozyme-TLL-IM y Lipozyme-RM-IM, inmovilizadas por adsorción (Martins *et al.*, 2014).

Cuando OPEr está inmovilizada en AG1-GA y AMNP-GA actúa más rápidamente sobre los sustratos de cadena más corta. Por último, los dos catalizadores en soporte G4 actúan de forma muy similar independientemente del mecanismo de inmovilización empleado.

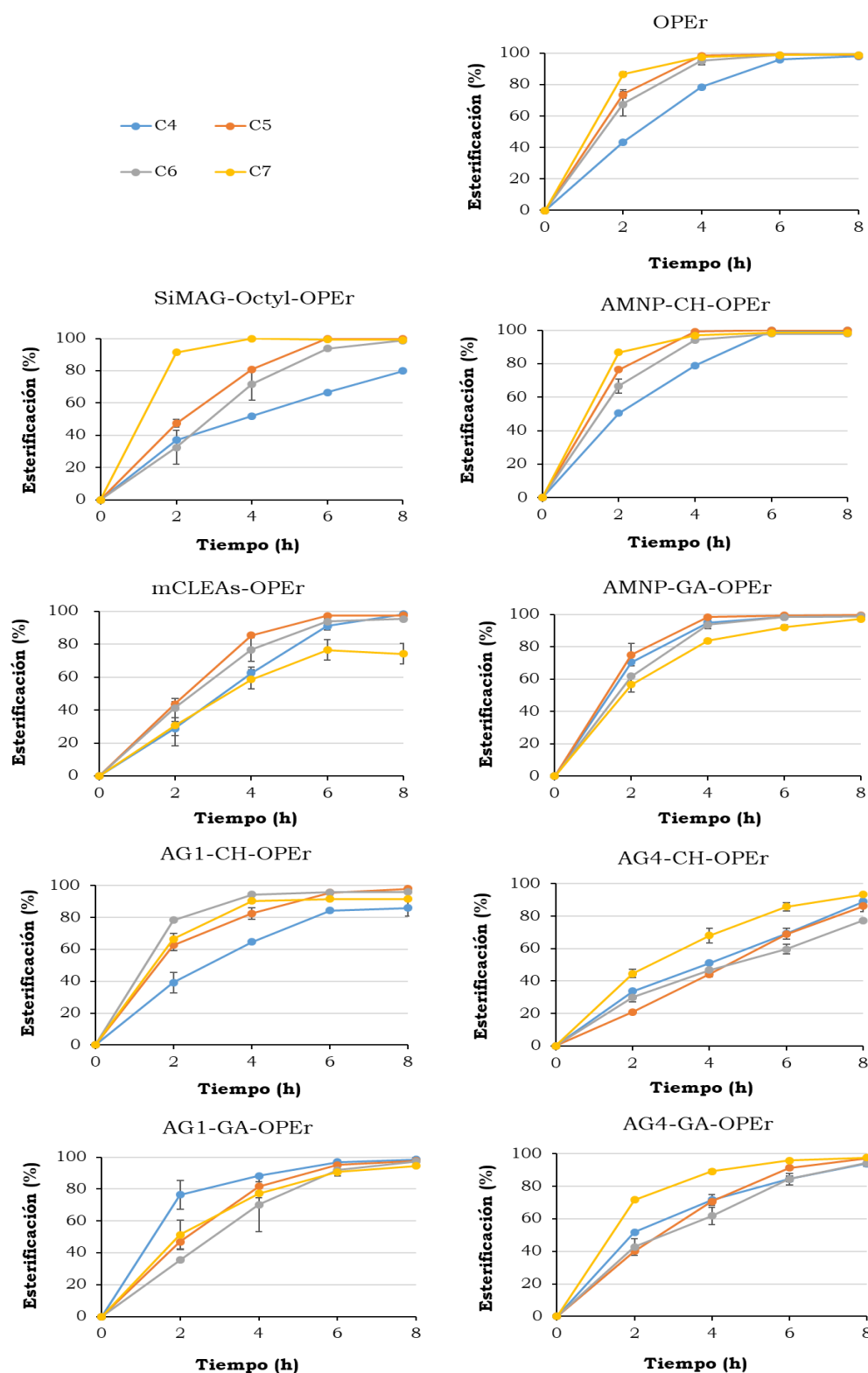


Figura 4.20. Curso de la esterificación, catalizada por OPEr, de 1-butanol y los ácidos: a) butanoico (C4), b) pentanoico (C5), c) hexanoico (C6), y d) heptanoico (C7). Condiciones de reacción: 100 rpm, 25 °C, 11 U de catalizador, 100 mM VFA en isooctano, 1-butanol: VFA (2:1).



Las reacciones con ácido heptanoico son más rápidas que con los otros tres sustratos, que se esterifican a un ritmo similar. La velocidad inicial de las reacciones catalizadas por las preparaciones no magnéticas de OPEr es inferior a la de las magnéticas, lo que puede depender de efectos vinculados al propio soporte, como por ejemplo posibles repulsiones electrostáticas en zonas con recubrimiento deficiente. El rendimiento final es igual o superior cuando empleamos enzima inmovilizada sobre MNPs, quizás por la compactación del catalizador no magnético cada vez que hay que manipularlo (p. ej., para toma de muestras), ya que hay que centrifugar a baja velocidad. Las MNPs se retiran con un imán externo y se resuspenden con una agitación suave, sin compactación y con poca pérdida de catalizador.

Tabla 4.12. Relación entre la longitud de cadena del VFA y la velocidad de la reacción en la zona de respuesta lineal (0-2 h).

Catalizador	Velocidad de reacción
<b>OPEr libre</b>	
<b>SiMAG-Octyl-OPEr</b>	C4<C5=C6<C7
<b>AMNP-CH-OPEr</b>	
<b>AG1-CH-OPEr</b>	
<b>mCLEAs-OPEr</b>	C4≈C5≈C6≈C7
<b>AG4-CH-OPEr</b>	C4=C5=C6<C7
<b>AG4-GA-OPEr</b>	

Los modelos que explican el mecanismo de acción de las lipasas son de tipo Ping-Pong Bi-Bi o de complejos ternarios (orden Bi-Bi). El primero es el más común, y describe el mecanismo como una reacción entre dos sustratos para rendir dos productos mediante la formación de intermediarios enzima-sustrato (Norjannah *et al.*, 2016). En la esterificación directa, el



primer paso consiste en la unión del donador de acilo a la enzima para formar un intermediario acil-enzima (Bousquet-Dubouch *et al.*, 2001; Choong *et al.*, 2018; SÁ *et al.*, 2017). Por lo tanto, la velocidad y eficiencia observadas para los catalizadores dependerán en gran medida de su afinidad y estabilidad frente a cada uno de los ácidos ensayados. Se ha descrito que las lipasas muestran menos afinidad por los sustratos de cadena más corta porque pueden inhibir su acción catalítica. Concretamente, los VFAs son más ácidos e hidrófilos a medida que disminuye la longitud de su cadena hidrocarbonada ( $C4 > C5 > C6 > C7$ ). En nuestro caso, como las reacciones se realizaron en un medio orgánico sin agua añadida, los sustratos ácidos pueden concentrarse en la capa de agua de la proteína inmovilizada, induciendo una importante acidificación local. Pires-Cabral *et al.* (2009) utilizaron una aproximación matemática para calcular la concentración de los sustratos ácido butírico y butanol en un microentorno de la lipasa de *C. rugosa* inmovilizada, en una reacción de esterificación directa similar a las realizadas en esta Tesis. Los resultados indicaron que la concentración de ácido butírico en esa zona era superior a la existente en el medio. Esto significa que cuanto menor sea el ácido graso, más ácido será el pH local de la capa de agua que rodea a la enzima (Guillén *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2005). Así, el efecto pH sería menos pronunciado en reacciones con OPEr libre porque la enzima se añadió en solución (7% de agua en la mezcla final), disminuyendo la acidez del entorno microacuoso de la enzima por dilución del ácido. Por otra parte, los nanobiocatalizadores con la enzima unida covalentemente mantendrían mejor la conformación de la enzima por su mayor rigidez, y serían más estables frente a los sustratos más ácidos. SiMAG-Octyl-OPEr, inmovilizada por simple adsorción y, por lo tanto, con un cierto grado de libertad estructural estaría más afectada por el pH local en el centro activo y perdería actividad más fácilmente. En el caso de las mCLEAs-OPEr, probablemente con la preparación covalente más rígida, el curso de las reacciones con los ácidos butírico, valérico y hexanoico fue bastante similar. Sin embargo, con el sustrato C7, los rendimientos de esterificación fueron un

25% más bajos que los obtenidos con cualquiera de los otros catalizadores incluidos en este estudio. Este ácido graso, que es el de cadena más larga de los evaluados, puede encontrar mayores impedimentos para acceder al centro activo de la enzima inmovilizada mediante este procedimiento. Por tanto, la rigidez de los nanobiocatalizadores parece afectar positivamente a la estabilidad a pH ácido y negativamente a la esterificación de los sustratos más grandes.

Puesto que la eficiencia de síntesis de los diferentes ésteres butílicos catalizada por AMNP-CH-OPeR o AMNP-GA-OPeR fue igual o superior a la de las otras preparaciones, seleccionamos estos dos nanobiocatalizadores para estudiar el efecto de algunos parámetros sobre la síntesis de ésteres, cuyos resultados que se analizarán más adelante, y para inmovilizar Cal A<sup>®</sup> y Cal B<sup>®</sup>.

#### **4.4.2. Esterificación directa catalizada por Cal A<sup>®</sup> y Cal B<sup>®</sup>**

Las preparaciones AMNP-CH- y AMNP-GA de las lipasas comerciales Cal A<sup>®</sup> y Cal B<sup>®</sup> y las dos enzimas libres se probaron en las mismas condiciones de esterificación. Las tres formas de Cal B<sup>®</sup> convirtieron el 100% de los sustratos en 2 h a partir de todos los sustratos ácidos (datos no mostrados). Martins *et al.* (2014) demostraron que esta enzima es mucho más eficiente que otras lipasas comerciales en la esterificación directa de distintos ácidos y alcoholes. Por el contrario, la eficiencia de la forma libre de Cal A<sup>®</sup> fue muy distinta según la longitud de cadena del ácido (Figura 4.21), rindiendo más de un 90% de esterificación para el ácido C5 al cabo de 8 h, entre un 60-70% para C4 y C6 y menos del 50% para C7.

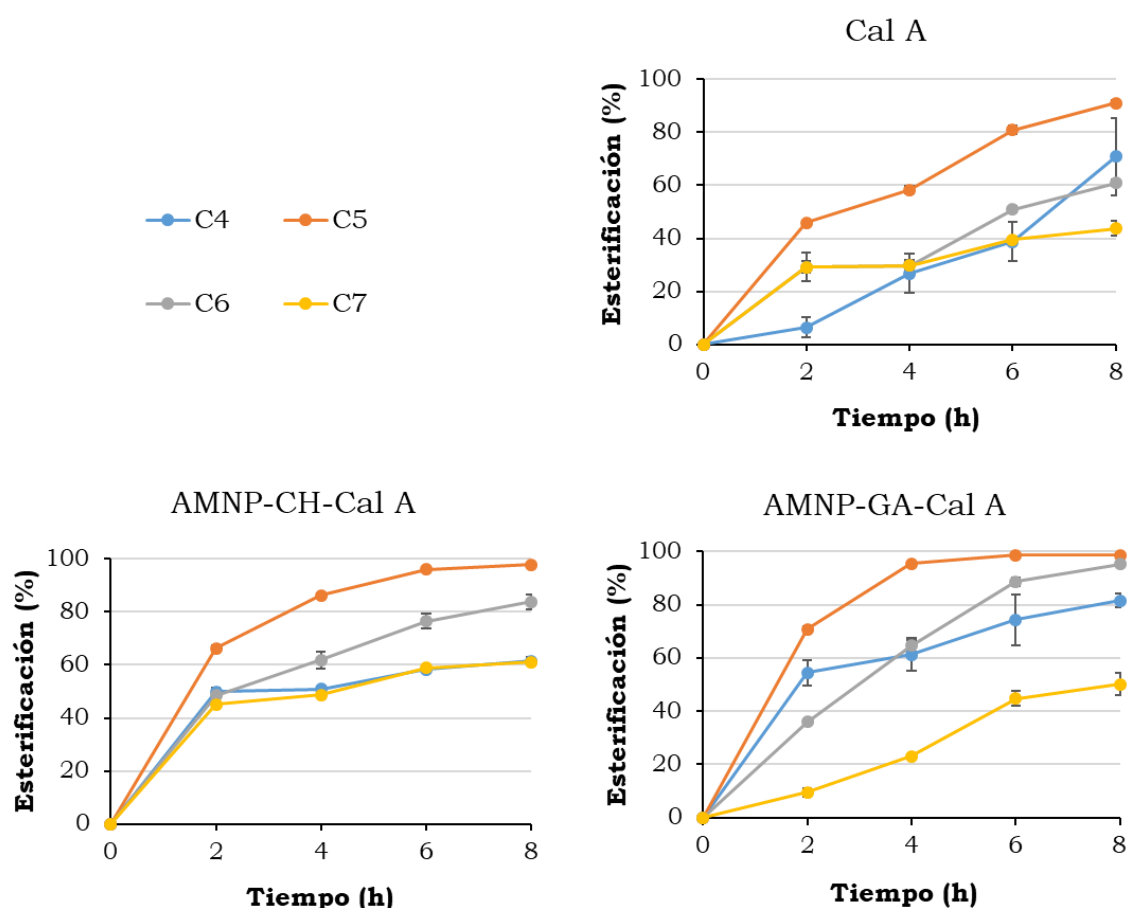


Figura 4.21. Comparación del curso de las reacciones de esterificación de 1-butanol y los ácidos butanoico (C4), pentanoico (C5), hexanoico (C6) y heptanoico (C7), catalizadas por Cal A<sup>®</sup> libre y sus nanobiocatalizadores. Condiciones de reacción: 100 rpm, 25 °C, 11 U de catalizador, 100 mM VFA en isooctano, 1-butanol: VFA (2:1).

Una vez inmovilizada, los rendimientos mejoraron en todos los casos, y es de destacar el incremento en la velocidad inicial en la síntesis del éster del ácido heptanoico con AMNP-CH-Cal A. Como ya se ha comentado, las cadenas de carbohidratos oxidados probablemente actuarían como brazos espaciadores largos y ligeramente flexibles (Knezevic *et al.*, 2006), pudiendo permitir la adaptación del centro activo de la enzima para el acceso del sustrato de cadena más larga. Esto es más difícil en AMNP-GA-Cal A, con un espaciador mucho más corto y directamente unido a la cadena peptídica, probablemente por varios puntos. Sin embargo, esta unión haría que la enzima sea

más estable, justificando el mejor rendimiento observado para los ésteres C4. Los resultados para C5 fueron excelentes en todos los casos, al igual que con OPEr en casi todas sus formas.

#### **4.4.3. Esterificación directa de los ácidos ramificados isobutírico e isovalérico catalizada por OPEr**

Además de los VFA de cadena lineal, también analizamos dos isoácidos disponibles comercialmente, el ácido isobutírico (ácido 2-metilpropanoico) y el ácido isovalérico (ácido 3-metilbutanoico) para evaluar el efecto de las ramificaciones sobre la actividad de OPEr. La Figura 4.22 muestra los rendimientos de esterificación de estos isoácidos en comparación con el ácido lineal. En general, la síntesis del éster isobutírico transcurrió más lentamente y fue menos eficiente que la del éster butírico. Como excepciones, destacamos las preparaciones más rígidas: mCLEAs-OPEr, AMNP-GA-OPEr y AG1-GA-OPEr. Al igual que con los ácidos lineales, los dos catalizadores sobre soporte G4 tienen rendimientos de síntesis similares, independientemente del procedimiento de inmovilización de OPEr.

Finalmente, la síntesis del éster isovalérico fue extremadamente ineficiente, con rendimientos máximos de reacción iguales o inferiores al 20%. La diferente posición del metilo de la cadena lateral en ambos sustratos, sumada a la mayor longitud de la cadena del isoácido C5 podría impedir su acomodación en el centro activo de la lipasa.

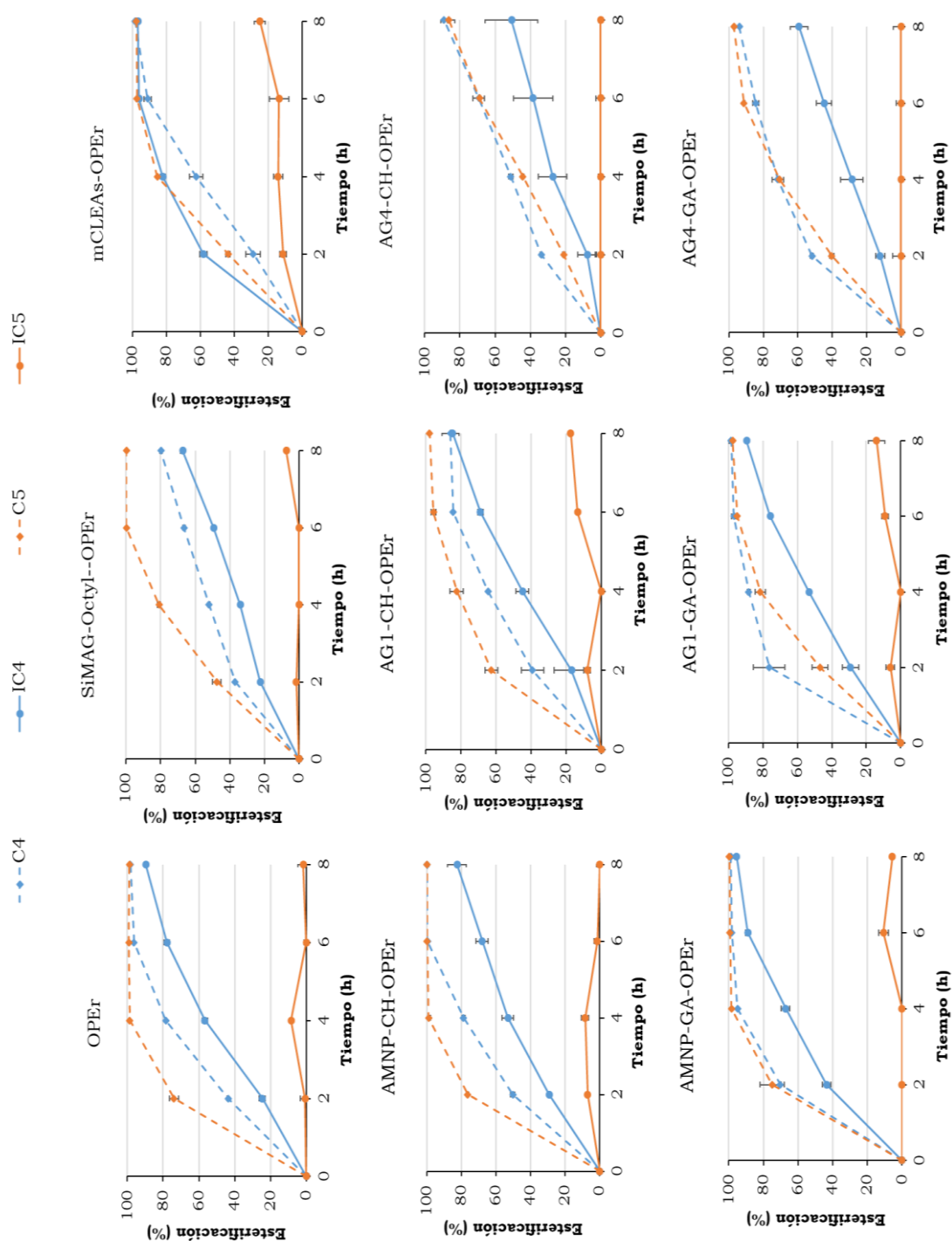


Figura 4.22. Comparación del curso de la esterificación, catalizada por OPEr, de 1-butanol y los isoácidos ramificados isobutírico e isopentanoico frente a los ácidos butírico y valérico. Condiciones de reacción: 100 rpm, 25 °C, 11 U de catalizador, 100 mM VFA en isooctano, 1-butanol: VFA (2:1).

#### 4.4.4. Efecto de la concentración de los sustratos

El empleo de altas concentraciones de sustratos en reacciones de síntesis suele ir acompañado de una mayor productividad. No obstante, sabemos que los sustratos que participan en esta reacción pueden afectar negativamente a la actividad de las lipasas. En este apartado, estudiaremos la influencia de la concentración de ácido y alcohol en la mezcla de reacción sobre las reacciones catalizadas por AMNP-CH-OPeR y AMNP-GA-OPeR, manteniendo la relación molar 1:2 (ácido:alcohol). Para los sustratos ácidos, la concentración evaluada estuvo en un rango comprendido entre 100 mM y 1 M, por tanto, para el 1-butanol fue de entre 200 mM y 2 M. El resto de los parámetros de la reacción permanecieron sin cambios.

Los datos presentados en la Figura 4.23 indican que, a concentraciones iniciales de VFA:1-butanol de hasta 250 mM:500 mM, el rendimiento superó el 80% al término de todas las reacciones (8 h). Las concentraciones más altas influyeron negativamente en el grado de esterificación, excepto en el caso del ácido heptanoico. Las cinéticas y porcentajes de esterificación fueron similares a todas las concentraciones ensayadas del ácido C7, con más del 80% de conversión en 4 h. Así, los resultados indican que las consecuencias adversas del uso de altas concentraciones de los ácidos son menos pronunciadas a medida que aumenta la longitud de la cadena del ácido graso volátil utilizado como sustrato.

De los datos de este experimento se pueden extraer varias conclusiones. En primer lugar, podemos decir que ambos nanobiocatalizadores producen heptanoato de butilo eficientemente a la concentración más alta analizada (Figura 4.23), 1 M de ácido heptanoico y 2 M de 1-butanol.

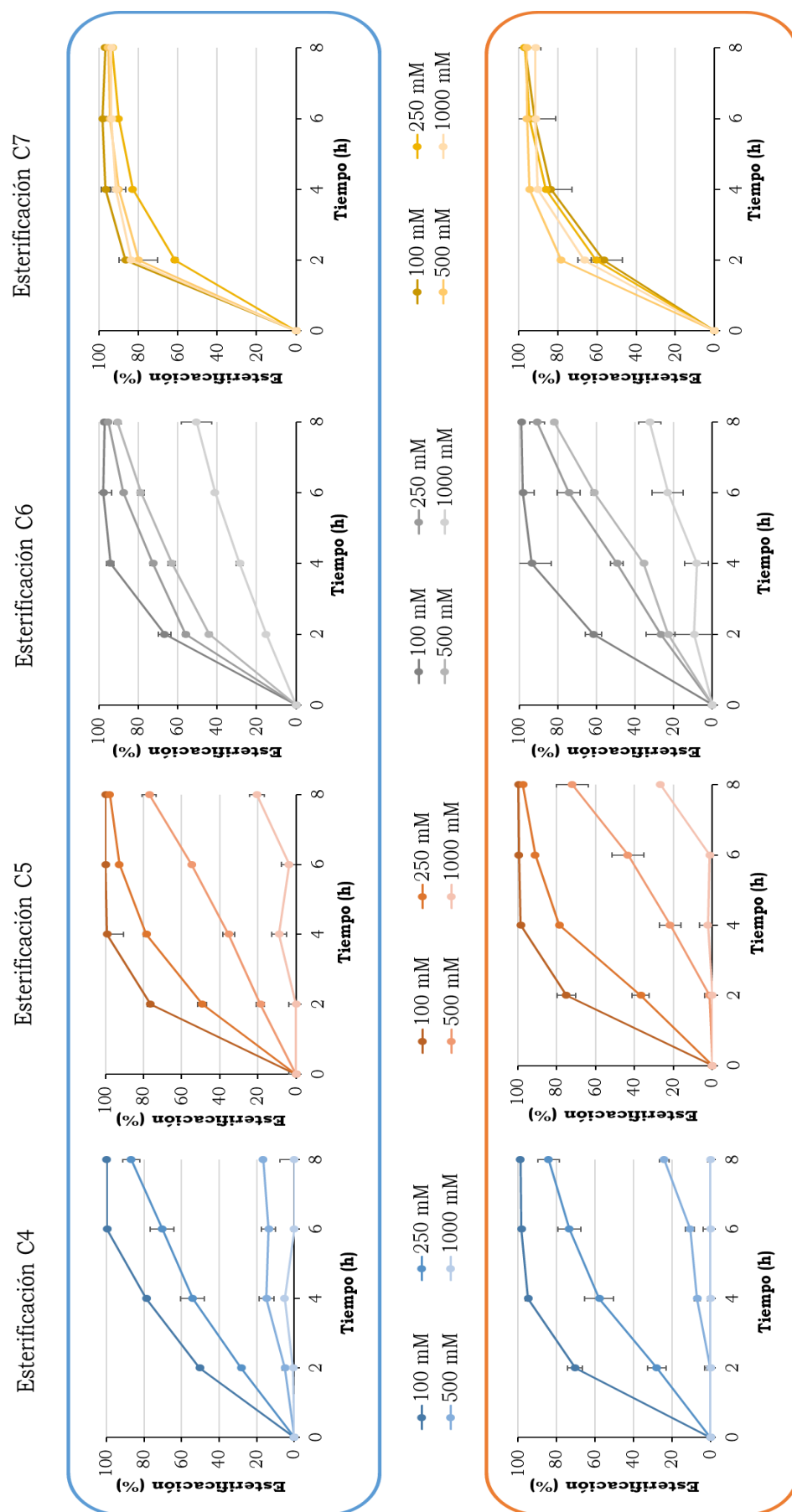


Figura 4.23. Efecto de la concentración de los sustratos en la esterificación de 1-butanol y los ácidos butanoico (C4), pentanoico (C5), hexanoico (C6), y heptanoico (C7). Reacciones catalizadas por AMNP-CH-OPeR (panel superior, azul) o AMNP-GA-OPeR (panel inferior, naranja). Condiciones de reacción: 100 rpm, 25 °C, 11 U de catalizador, 1-butanol: VFA (2:1) en isooctano.



Este resultado también nos indica que la actividad del catalizador no se ve afectada por las altas concentraciones de 1-butanol, apoyando la hipótesis de que el efecto observado en la esterificación de los ácidos de cadena más corta se debe a la inhibición o inactivación de la enzima debida al sustrato ácido (Pires-Cabral *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2005).

Los resultados, que son muy similares para ambos nanobiocatalizadores, también nos indican los tiempos de reacción y los rangos de concentración óptimos para cada uno de los sustratos y concentraciones probadas:

- Butirato de butilo: 250 mM, 8 h
- Valerato de butilo: 250 mM, 6 h
- Hexanoato de butilo: 500 mM, 8 h
- Heptanoato de butilo: 1 M, 4-6 h

En general, AMNP-CH-OPER se vio ligeramente menos afectada por el aumento de la concentración de ácido que AMNP-GA-OPER, lo que concuerda con los datos registrados para la estabilidad a pH de ambas preparaciones (sección 4.3.5.2).

#### **4.4.5.Efecto de la proporción molar de los sustratos**

La proporción molar de los sustratos es uno de los factores que más influyen en la marcha de una reacción enzimática. Por ejemplo, un exceso molar de uno de los sustratos suele desplazar el equilibrio hacia la síntesis, aunque también puede tener efectos negativos sobre la enzima. El exceso de alcohol puede contribuir a neutralizar la acidez del otro sustrato de la reacción, pero algunos alcoholes desestabilizan la enzima al interaccionar con su capa acuosa (Khan and Rathod, 2015) o, al estar presentes en exceso, promueven la unión no productiva de una molécula de alcohol a la lipasa en la primera etapa de la catálisis, compitiendo con el ácido (Guillén *et al.*, 2012). En general, si los rendimientos de la reacción son lo suficientemente buenos, se prefiere el uso de cantidades estequiométricas, ya que evita tener



que recuperar el sustrato presente en exceso y facilita la purificación del producto.

En nuestro caso, ya sabemos que OPEr funciona correctamente en presencia de altas cantidades de 1-butanol, mientras que parece que el sustrato ácido es más dañino. Por ello, puesto que el experimento estándar se realizó a una proporción VFA:alcohol (1:2), se decidió mantener constante la concentración del ácido y ensayar proporciones (1:1) y (1:3) en reacciones catalizadas por AMNP-CH-OPEr y AMNP-GA-OPEr (Figura 4.24). El uso de cantidades estequiométricas de los sustratos produjo rendimientos de esterificación y tasas de reacción algo más bajos que los observados en el ensayo estándar con ambos biocatalizadores. En presencia de exceso de 1-butanol los porcentajes de esterificación fueron similares a los del ensayo estándar para todos los ácidos grasos a las 8 h de reacción. A la vista de estos resultados, se decidió mantener la proporción 1:2 para posteriores ensayos.

La influencia de la proporción molar de sustratos en reacciones similares, catalizadas por lipasas inmovilizadas, es dispar. Friedrich *et al.* (2013) compararon el efecto de este parámetro sobre la síntesis de butirato de etilo catalizada por dos preparaciones de la lipasa B de *C. antarctica*, encontrando que éstas respondían de forma opuesta. Del mismo modo, Martins *et al.* (2013) probaron dos preparaciones de la lipasa de *T. lanuginosus* inmovilizada en la síntesis de butirato de butilo, describiendo que las proporciones óptimas de los sustratos eran diferentes para cada una de ellas. En un trabajo posterior del mismo grupo se detalla que, en las condiciones óptimas para las lipasas inmovilizadas Novozym 435, Lipozyme-TLL-IM® y Lipozyme-RM-IM®, los mejores rendimientos se obtuvieron con exceso de ácido, utilizando relaciones molares 1:3, 1:2,4 y 1:1,7, respectivamente (Martins *et al.*, 2014).

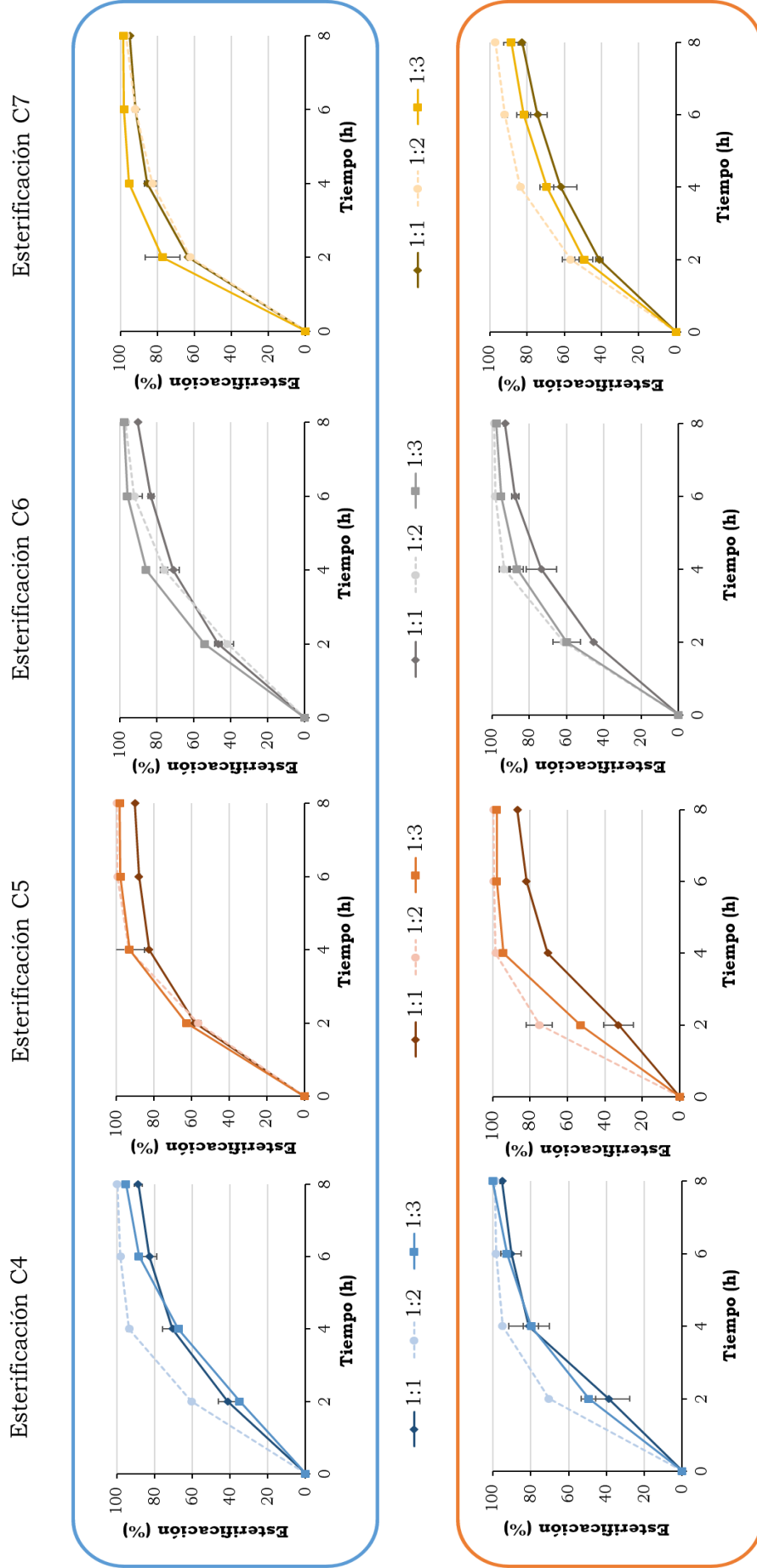


Figura 4.24. Efecto de la proporción molar de 1-butanol y cada VFA en el curso temporal de la esterificación catalizada por AMNP-CH-OPeR (arriba) y AMNP-GA-OPeR (abajo): a) butanoico (C4); b) pentanoico (C5); c) hexanoico (C6); y d) ácido heptanoico (C7). Condiciones de reacción: 100 rpm, 25 °C, 11 U de catalizador, VFA 100 mM en isoctano.

De forma similar, se observó una disminución de la tasa de reacción para la lipasa recombinante de *R. oryzae* (rROL), inmovilizada por adsorción sobre EP-100 y Octadecyl Sepabeads o covalentemente en Eupergit CM, en presencia de un exceso de alcohol. La preparación covalente de rROL también se vio afectada tanto por exceso de ácido como de alcohol en la mezcla de reacción (Guillén *et al.*, 2012).

Para AMNP-CH-OPER las diferencias entre ambas relaciones molares son muy leves o inexistentes. En el caso de AMNP-GA-OPER, la presencia de un exceso moderado de alcohol produjo los mejores rendimientos de esterificación en los tiempos más cortos con todos los ácidos grasos utilizados como donadores de acilo.

#### **4.4.6. Reciclabilidad de AMNP-CH-OPER y AMNP-GA-OPER en la síntesis de ésteres butílicos**

La evaluación de la estabilidad operacional o reciclabilidad de una enzima inmovilizada es la comprobación final de su potencial como biocatalizador para un determinado proceso ya que, de no mantenerse la actividad durante un número de ciclos razonable, los gastos derivados de la insolubilización de la enzima carecerían de sentido. La disminución de la actividad de un biocatalizador inmovilizado después de repetidos ciclos de reacción puede deberse a varios factores, como la pérdida de enzima, su inhibición por el sustrato o el producto, o su inactivación en las condiciones de reacción.

Analizamos la estabilidad de AMNP-CH-OPER y AMNP-GA-OPER, los dos nanobiocatalizadores seleccionados, en ciclos sucesivos de síntesis de los ésteres butílicos de VFAs C4-C7. Para facilitar la comparación de los resultados, la concentración de todos los ácidos ensayados se fijó en 250 mM, ya que en estas condiciones el rendimiento de esterificación superó siempre el 80% en 8 h (Figura 4.23), manteniendo la proporción molar 1:2. La Figura 4.25 muestra el porcentaje de esterificación a lo largo

de 7 ciclos de síntesis con los dos nanobiocatalizadores seleccionados.

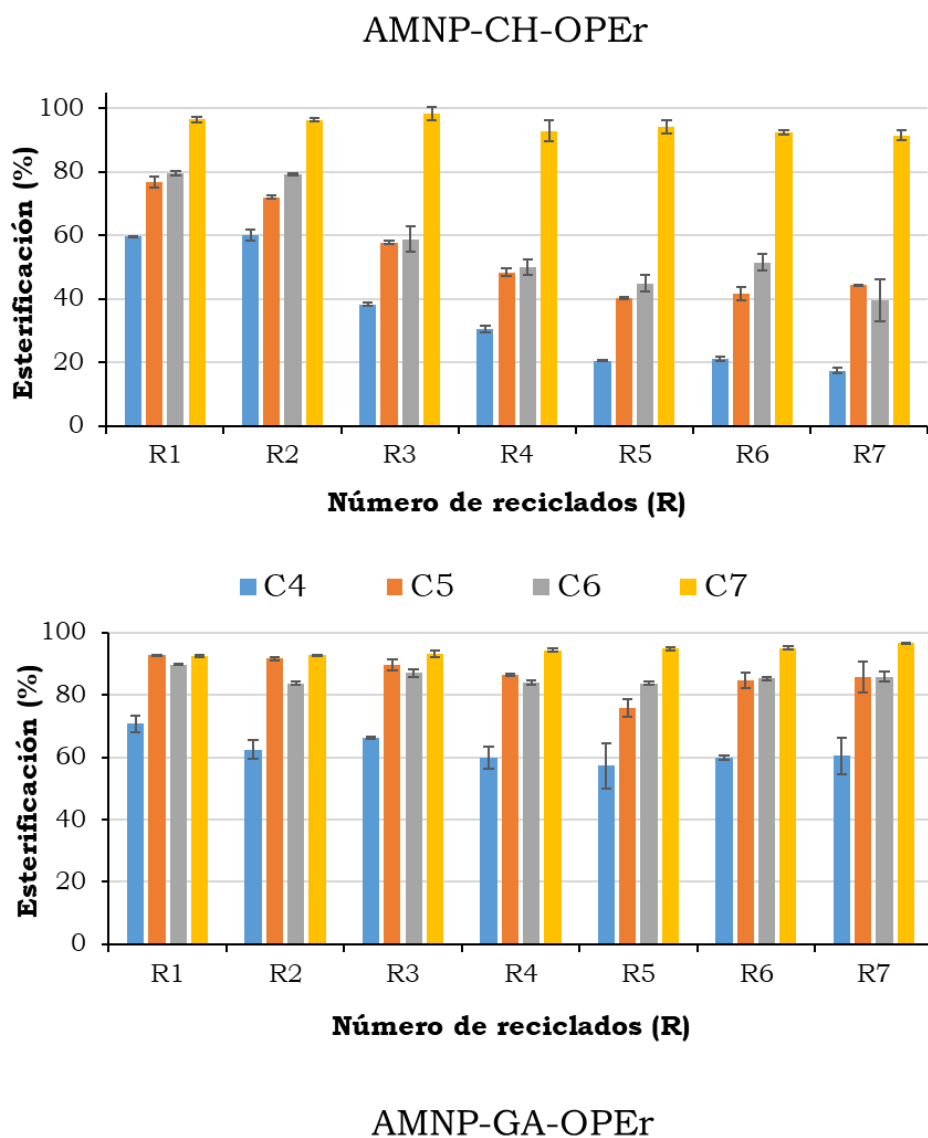


Figura 4.25. Estabilidad operacional de AMNP-CH-OPeR (arriba) y AMNP-GA-OPeR (abajo) en siete ciclos de esterificación con 500 mM de 1-butanol y 250 mM de cada VFA.

Para los ácidos C4, C5 y C6, se observa una disminución del rendimiento de las reacciones catalizadas por AMNP-CH-OPeR a partir del tercer ciclo de reacción (R3), llegando a ser del 50% al cabo de 7 ciclos. Sin embargo, el rendimiento no se redujo de forma significativa con el sustrato C7. Con el otro catalizador,

AMNP-GA-OPeR, la pérdida de eficiencia es como máximo del 15% a lo largo de los sucesivos ciclos de reacción. Como se esperaba, esta disminución en los rendimientos fue mayor para las reacciones con ácido butírico, y nula para la síntesis del éster heptanoico. Estos datos confirman la buena estabilidad de AMNP-GA-OPeR en la síntesis de este tipo de ésteres, y ratifican que la estabilidad de ambos nanobiocatalizadores es mejor cuanto mayor es la longitud de la cadena del VFA.

La reciclabilidad de enzimas inmovilizadas en la síntesis de este tipo de compuestos ha sido estudiada por otros autores. La esterasa de *Bacillus licheniformis* mostró una disminución de su rendimiento en ciclos sucesivos de esterificación de ácido caproico con etanol (Alvarez-Macarie and Baratti, 2000). A partir del cuarto ciclo, la actividad cae drásticamente hasta el 6% en el octavo reciclado. La lipasa de *C. rugosa* inmovilizada sobre óxido de grafeno mostró una reciclabilidad superior, perdiendo sólo el 10% de su actividad después de 10 ciclos de reacción (Patel *et al.*, 2015). Un comportamiento similar se ha descrito para Novozym 435, que mantuvo el 80% de actividad tras 10 reacciones consecutivas. Otras lipasas comerciales (Lipozyme RM-IM y Lipozyme TL-IM) demostraron ser mucho menos estables, con pérdidas de actividad de entre 70% y 100%, respectivamente, después de cuatro ciclos (Martins *et al.*, 2014). Otras hidrolasas, como la cutinasa de *Fusarium oxysporum* inmovilizada como CLEAs, mantuvieron menos del 60% del rendimiento inicial en el cuarto reciclado (Nikolaivits *et al.*, 2017). De todo se deduce que, principalmente, la AMNP-GA-OPeR tiene unas excelentes propiedades para su reutilización en esta aplicación.

#### **4.5. Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga (biodiesel)**

El biodiesel está compuesto por ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes de cadena corta, generalmente metanol y etanol. Este biocombustible se obtiene

industrialmente mediante transesterificación química de triglicéridos, generalmente con catalizadores alcalinos. Sin embargo, en esta reacción se producen jabones, especialmente si el aceite empleado contiene ácidos grasos libres, y esta reacción secundaria disminuye los rendimientos de biodiesel y dificulta notablemente la separación y purificación de los productos de reacción. La aplicación de métodos enzimáticos permite realizar estas reacciones y sintetizar ésteres a partir de los ácidos grasos libres mediante esterificación directa (Moazeni *et al.*, 2019; Norjannah *et al.*, 2016). La producción de biodiesel mediante transesterificación de aceite de girasol y metanol catalizada por lipasas fue reportada por primera vez hace tres décadas (Mittelbach, 1990). Sin embargo, esta reacción sigue planteando retos importantes, como la falta de estabilidad operativa a largo plazo en presencia de alcoholes y la acumulación del glicerol generado como coproducto (Xie and Huang, 2018), y la inmovilización puede contribuir a solucionar estos problemas.

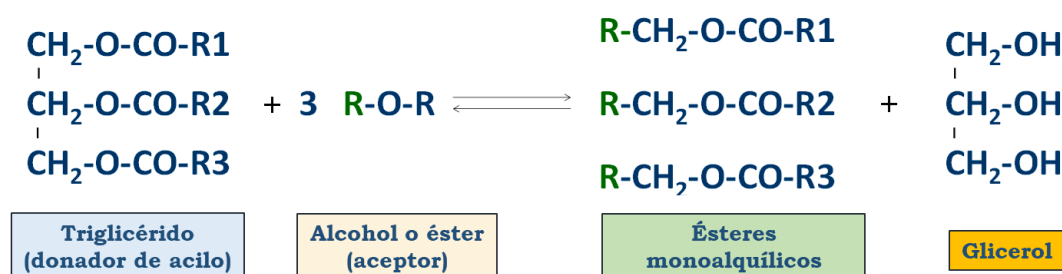


Figura 4.26. Esquema simplificado de una reacción de transesterificación para la síntesis de biodiesel.

La Figura 4.26 muestra un esquema de la transesterificación completa de un triglicérido y un alcohol, en la que una molécula del donador reacciona con tres del aceptor para producir tres moléculas de ésteres y una de glicerol. Como ya hemos visto, el mecanismo de acción de las lipasas es de tipo Ping-Pong Bi-Bi, aunque se han descrito varios modelos diferentes para explicar la transesterificación de glicéridos. El modelo en un paso

describe la alcoholisis directa del triglicérido, en la que el alcohol es responsable de su ruptura y esterifica el ácido graso liberado. El modelo en dos pasos requiere de la presencia de agua en el medio. En una primera fase el agua hidroliza el triglicérido, y en la segunda etapa se produce la esterificación directa de los ácidos grasos liberados. Canet *et al.* (2016) repasaron los mecanismos descritos y propusieron uno nuevo que tiene en cuenta la presencia de ácidos grasos libres en el medio de reacción. El sistema de estudio incluía como sustratos metanol y aceite de oliva en mezcla con 0-20% de ácido oleico, y como catalizador la lipasa rROL, producida en *P. pastoris* e inmovilizada. Sus conclusiones confirman que ambos procesos coexisten y demuestra que los ácidos grasos libres neutralizan la polaridad del metanol, mejorando la velocidad de reacción y la estabilidad del biocatalizador. El modelo elaborado por Andrade *et al.* (2017) para describir la metanolisis de aceite de ricino catalizada por Eversa<sup>®</sup>, llega a conclusiones similares sobre la simultaneidad de ambos procesos, con dominancia de la síntesis sobre la hidrólisis.

En esta Tesis, se evaluó la capacidad de producir biodiesel a partir de metanol y aceite de cocina usado (de oliva). El uso de un residuo urbano como fuente de triglicéridos encaja bien dentro de un esquema de economía circular y permite reducir el coste imputable a las materias primas, que no debe exceder el 50% de los costes de producción (Jamil *et al.*, 2018). Por otra parte, el metanol es el alcohol más común para esta aplicación porque los ésteres metílicos producen el máximo rendimiento en los motores y por su bajo precio. Gracias a su pequeño tamaño y elevada polaridad es un aceptor muy eficiente, aunque puede desactivar, desnaturalizar o inhibir a la enzima (Norjannah *et al.*, 2016). Estos efectos negativos estarían relacionados con el bloqueo del centro activo, la inducción de cambios conformacionales o pérdida del plegamiento, poca miscibilidad del aceite y el metanol, o adsorción del alcohol sobre soportes de inmovilización polares. Para compensar la posible evaporación del alcohol en las condiciones de reacción y muestreo, se escogió



trabajar con una relación molar metanol:aceite de 4:1, desarrollando las reacciones a temperatura ambiente, sin añadir tamices moleculares o agentes desecantes, y en ausencia de cosolvente.

#### **4.5.1. Síntesis de biodiesel catalizada por OPEr**

En la Figura 4.27 se muestra el curso temporal de las reacciones de metanolisis catalizadas por OPEr inmovilizada por distintos procedimientos. Se observa que la lipasa soluble produjo alrededor de un 20% de ésteres metílicos (EMs) en 24 h, mientras que las reacciones con los nanobiocatalizadores magnéticos rindieron entre un 50-90% (Figuras 4.27 b-e) y los no magnéticos sobre el soporte AG1 un 75-85% (Figuras 4.27 f-g). Por su escasa efectividad en esta reacción (<20% transesterificación), no se muestran en la figura los resultados correspondientes a los nanobiocatalizadores sobre soporte G4 que, de nuevo, se comportaron de forma muy diferente al resto (Tablas Anexo II h-i).

La baja eficiencia observada en la reacción con la lipasa soluble puede deberse a la inevitable presencia de un 10% de fase acuosa aportada al añadir la enzima, que puede influir en el rendimiento de la alcoholisis (Tan *et al.*, 2010). Cuando se emplean los nanobiocatalizadores, tan solo quedaría una pequeñísima cantidad de agua humedeciéndolos, ya que la mayor parte de ella se retira (con un imán o por centrifugación) tras depositarla en el vial en el que se desarrollará la reacción.

En la Tabla 4.13 se muestran los resultados (%) del análisis cromatográfico de reacciones de 24 h, valorando el contenido en acil-glicéridos, ácidos grasos libres y ésteres metílicos. Los datos se han ordenado en función del método utilizado para inmovilizar OPEr. Se observa que la inmovilización de OPEr incrementa drásticamente su capacidad de síntesis de biodiesel. La enzima soluble produce un 20% de ésteres metílicos, mientras que los nanobiocatalizadores sintetizan 50-92%.



En este punto es preciso considerar que, por razones técnicas, estas reacciones llevaban 100 mg de cada nanobiocatalizador, por lo que la dosis enzimática no es uniforme ya que las preparaciones tenían distinta actividad específica (Tabla 4.9). Esto es especialmente relevante para AMNP-GA-OPeR, cuya actividad específica era entre 2 y 3 veces inferior a la del resto, justificando su reducida actividad sintética. Probablemente, igualando la dosis catalítica, este catalizador tendría una eficiencia comparable a los demás.

Tabla 4.13. Rendimiento de cada catalizador en la síntesis de EMs al cabo de 24 h en el primer ciclo de reacción. Se muestran los valores de TGs residuales y de productos intermedios. TGs: triglicéridos; DGs: diglicéridos; MGs: monoglicéridos; AGs: ácidos grasos; EMs: ésteres metílicos. Se muestra en negrita los valores más destacados para cada compuesto en cada catalizador, y subrayado los valores de EMs más altos.

Catalizador	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
AMNP-CH-OPeR	6,6 ± 1,1	<b>10,2 ± 2,0</b>	0,1 ± 0	3,4 ± 0,3	<u>84,9 ± 4,2</u>
AG1-CH-OPeR	3,4 ± 0,1	7,3 ± 0,7	<b>7,0 ± 0,5</b>	8,6 ± 1,6	75,3 ± 9,4
AMNP-GA-OPeR	<b>38,1 ± 3,6</b>	9,4 ± 0,5	1,3 ± 0,2	2,2 ± 0,7	50,0 ± 0,8
AG1-GA-OPeR	2,7 ± 0,4	4,9 ± 1,4	4,2 ± 2,8	4,5 ± 0,0	<u>84,7 ± 5,0</u>
mCLEAs-OPeR	4,0 ± 2,1	6,0 ± 4,7	0,1 ± 0,0	2,5 ± 0,1	<b>92,2 ± 5,3</b>
SiMAG-Octyl-OPeR	4,9 ± 2,9	3,1 ± 1,2	0,2 ± 0,0	<b>14,7 ± 0,9</b>	<u>83,6 ± 2,9</u>
OPeR	<b>76,0 ± 4,9</b>	<b>6,2 ± 0,1</b>	<b>0,1 ± 0</b>	<b>2,0 ± 0,3</b>	<b>20,0 ± 0,2</b>

Dejando esta preparación aparte, teniendo en cuenta el valor de las desviaciones estándar calculadas, los resultados indican que la actividad de todos los nanobiocatalizadores en la síntesis de ésteres metílicos es similar. Destacan las mCLEAs-OPeR por su rendimiento ligeramente superior y porque el porcentaje de EMs a tiempos intermedios (9 h) era ya del 80%, mientras que en los demás era 40-60%.

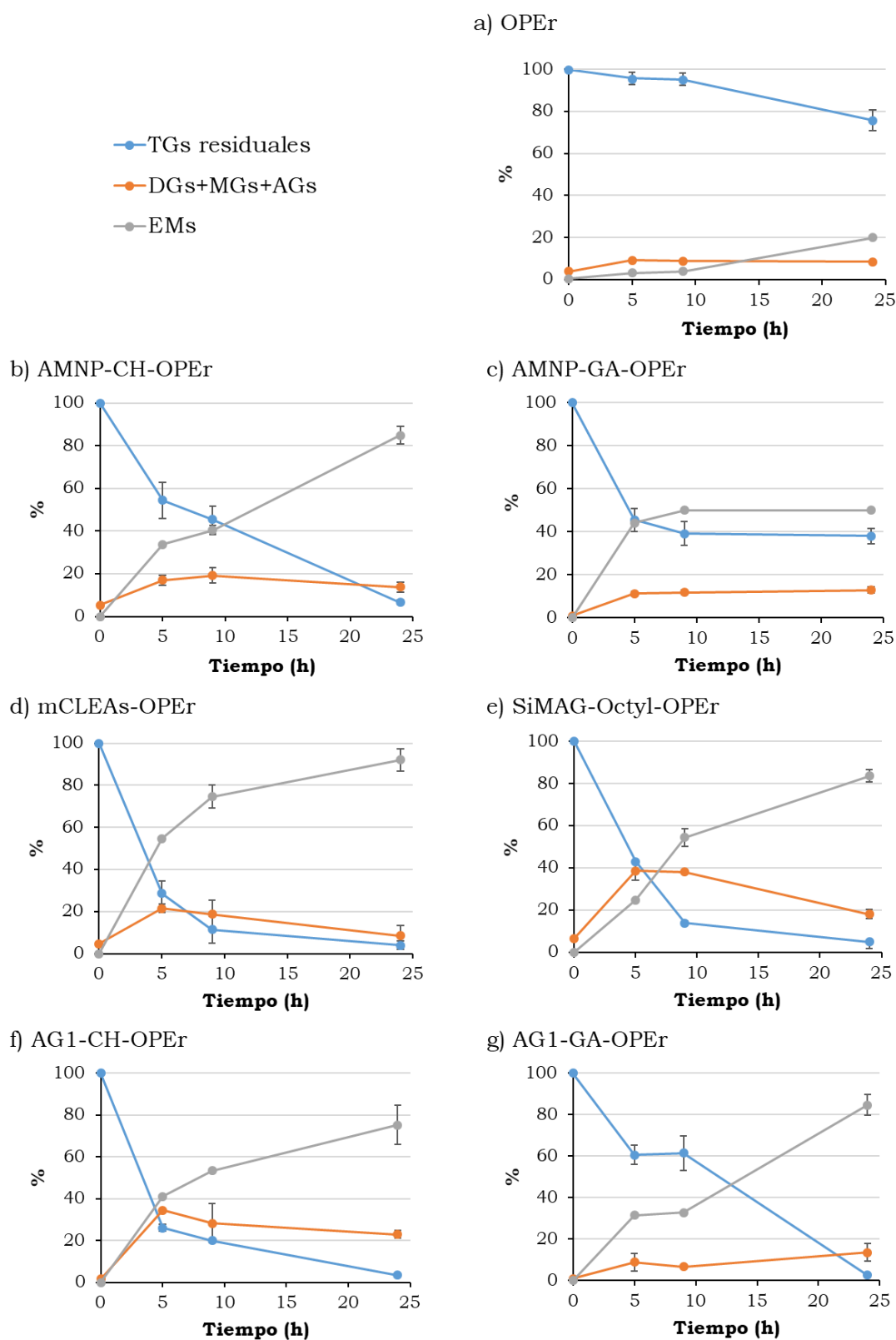


Figura 4.27. Evolución en el tiempo de la transesterificación enzimática de aceite de cocina reciclado y metanol los nanobiocatalizadores de OPER. Las reacciones se desarrollaron a 25 °C, con una agitación rotatoria de 100 rpm, una relación aceite:metanol de 1:4 y 100 mg de cada nanobiocatalizador. En ningún momento se añadió ni se quitó agua del sistema de reacción.

Excluyendo AMNP-GA-OPeR, el análisis de la composición de las reacciones tras 24 h de metanolisis nos permite observar pequeñas diferencias entre los nanobiocatalizadores. La horquilla de TGs residuales es estrecha, entre 2,7% y 6,6% pero, por ejemplo, cuando OPeR está inmovilizada sobre el soporte magnético AMNP a través de sus cadenas glucídicas (AMNP-CH-OPeR), se percibe una tendencia a la acumulación de DGs superior a la observada en el resto de las reacciones. Sin embargo, para el mismo tipo de inmovilización, con el soporte AG1, las proporciones de productos intermedios son similares entre sí, sin que haya una acumulación preferente de ninguno de ellos. Finalmente, en la reacción catalizada por SiMAG-Octyl-OPeR destaca la acumulación de AGs a tiempo final y de productos intermedios a las 5 h (Tabla Anexo II e).

#### **4.5.2. Síntesis de biodiesel catalizada por las enzimas comerciales**

Las preparaciones AMNP-CH- y AMNP-GA- de las lipasas comerciales Cal A<sup>®</sup>, Cal B<sup>®</sup> y Eversa<sup>®</sup>, y las tres enzimas solubles se ensayaron en las mismas condiciones de alcoholisis descritas en el apartado anterior, demostrando grandes diferencias en cuanto a su actividad en esta reacción.

Cal B<sup>®</sup>. La capacidad de esta enzima para catalizar la metanolisis de los triglicéridos del aceite, tanto en su forma soluble como inmovilizada, fue insignificante. El porcentaje de EMs no alcanzó el 5% en el primer ciclo de reacción de 24 h (Tablas Anexo II O-Q). Estos resultados se pueden justificar considerando la baja temperatura de reacción (25 °C) y la alta susceptibilidad de Cal B<sup>®</sup> al metanol, que parece basarse en la sustitución de las moléculas de agua de la superficie de la proteína por alcohol (Li *et al.*, 2010; Lotti *et al.*, 2018).

El uso de Cal B<sup>®</sup> inmovilizada para producir biodiesel ha sido estudiado en múltiples ocasiones. Ferrario *et al.*, (2013) describieron rendimientos de 5-10% en la metanolisis de

trioleína para varias preparaciones de Cal B<sup>®</sup> inmovilizada y para Novozym 435. Esta última se utilizó como referencia por ser la preparación comercial de Cal B<sup>®</sup>, adsorbida vía activación interfacial sobre la resina macroporosa Lewatit VP OC 1600, comercializada por Novozymes y todo un referente entre las lipasas inmovilizadas desde 1992. Los autores sugirieron que la baja tasa de transesterificación era debida a la adsorción de metanol a los soportes durante la reacción. Sin embargo, otros trabajos reportan rendimientos de transesterificación de entre 78-96% en distintas condiciones de reacción, aunque la actividad se pierde en pocos ciclos (Ortiz *et al.*, 2019). Talukder *et al.* (2009) consiguieron sintetizar un 92% de biodiesel mediante metanolisis de aceite de palma no refinado catalizado por Novozym 435. Pasando a otros formatos, Miao *et al.* (2018), sintetizaron un 90% de EMs a partir de aceite de soja (24 h, 45 °C, metanol:aceite 6:1) utilizando AMNP-GA-Cal B (sintetizadas mediante otra metodología) y en Tacias-Pascacio *et al.* (2017) se describen rendimientos del 70% con esta enzima inmovilizada sobre octadecil-metacrilato. En este último trabajo se indica que la misma enzima, inmovilizada sobre el copolímero divinilbenceno, (DVB)-metacrilato, presentó muy baja actividad, demostrando que el soporte y el procedimiento de inmovilización sirven para modular la actividad de una enzima. Modenez *et al.* (2018) inmovilizaron Cal B<sup>®</sup> sobre la superficie de nanopartículas magnéticas dentro de micelas inversas, obteniendo rendimientos de transesterificación superiores al 50% a 27 °C en 24 h, y Mehrasbi *et al.* (2017) inmovilizaron esta misma lipasa sobre MNPs activadas con grupos epoxi y utilizaron este biocatalizador para la metanolisis de aceite de cocina usado, obteniendo un 34% de ésteres metílicos en reacciones de 72 h a 50 °C.

Cal A<sup>®</sup>. Los ensayos realizados con la forma soluble de Cal A<sup>®</sup> demostraron su baja eficiencia en síntesis de biodiesel, similar a la observada para OPEr (Figuras 4.27 a OPEr y 4.28 a Cal A<sup>®</sup>). El perfil de la metanolisis catalizada por AMNP-GA-OPEr fue ligeramente peor que el de la enzima libre, con un rendimiento máximo de ésteres del 11% (Figura 4.27 c). Sin embargo, AMNP-

CH-Cal A produjo un 83% de EMs e hidrolizó prácticamente todos los TGs disponibles (Figura 4.28 b). Al analizar la mezcla de reacción se detectó un 13% de AGs libres (Tabla Anexo II k), lo que sugiere que no había suficiente cantidad de metanol para completar su transformación en EMs, ya sea por error en la dispensación o por evaporación durante la toma de muestras.

La lipasa Cal A<sup>®</sup> se ha utilizado en numerosas reacciones de interés industrial (Domínguez de María *et al.*, 2005), pero esta es la primera vez que se emplea en síntesis de biodiesel, ya sea libre o inmovilizada. Un solo estudio describe su inmovilización covalente en perlas de agarosa utilizando GA (Fernández-Lorente *et al.*, 2006) y otros recogen su inmovilización por hidrofobicidad sobre varios tipos de soportes (Tacias-Pascacio *et al.*, 2017, 2016), pero en todos los casos solo prueban las preparaciones en reacciones de hidrólisis.

Eversa<sup>®</sup>. La enzima comercial diseñada por Novozymes para la síntesis de biodiesel mostró un excelente comportamiento en estas condiciones de reacción, tanto en su forma soluble como inmovilizada, convirtiendo la totalidad del sustrato en EMs (Figura 4.28 d-f). No obstante, parece que la inmovilización incrementa su velocidad de biocatálisis, la enzima libre produce alrededor del 60% de EMs tras 9 h de reacción, mientras que las formas inmovilizadas sintetizaron alrededor del 80% de biodiesel en el mismo tiempo (Figura 4.28 e y f).

Eversa<sup>®</sup> inmovilizada sobre cuatro soportes hidrofóbicos observando la conversión total del aceite en ésteres metílicos en tiempos cortos. Un segundo trabajo (Arana-Peña *et al.*, 2018) habla de la inmovilización no covalente de Eversa<sup>®</sup> en perlas de agarosa funcionalizadas con grupos octilo o aminadas aunque se limitan a valorar su actividad en hidrólisis de varios ésteres. Por tanto, cabe destacar que en esta Tesis se han sintetizado por primera vez catalizadores inmovilizados covalentemente con Eversa<sup>®</sup>.

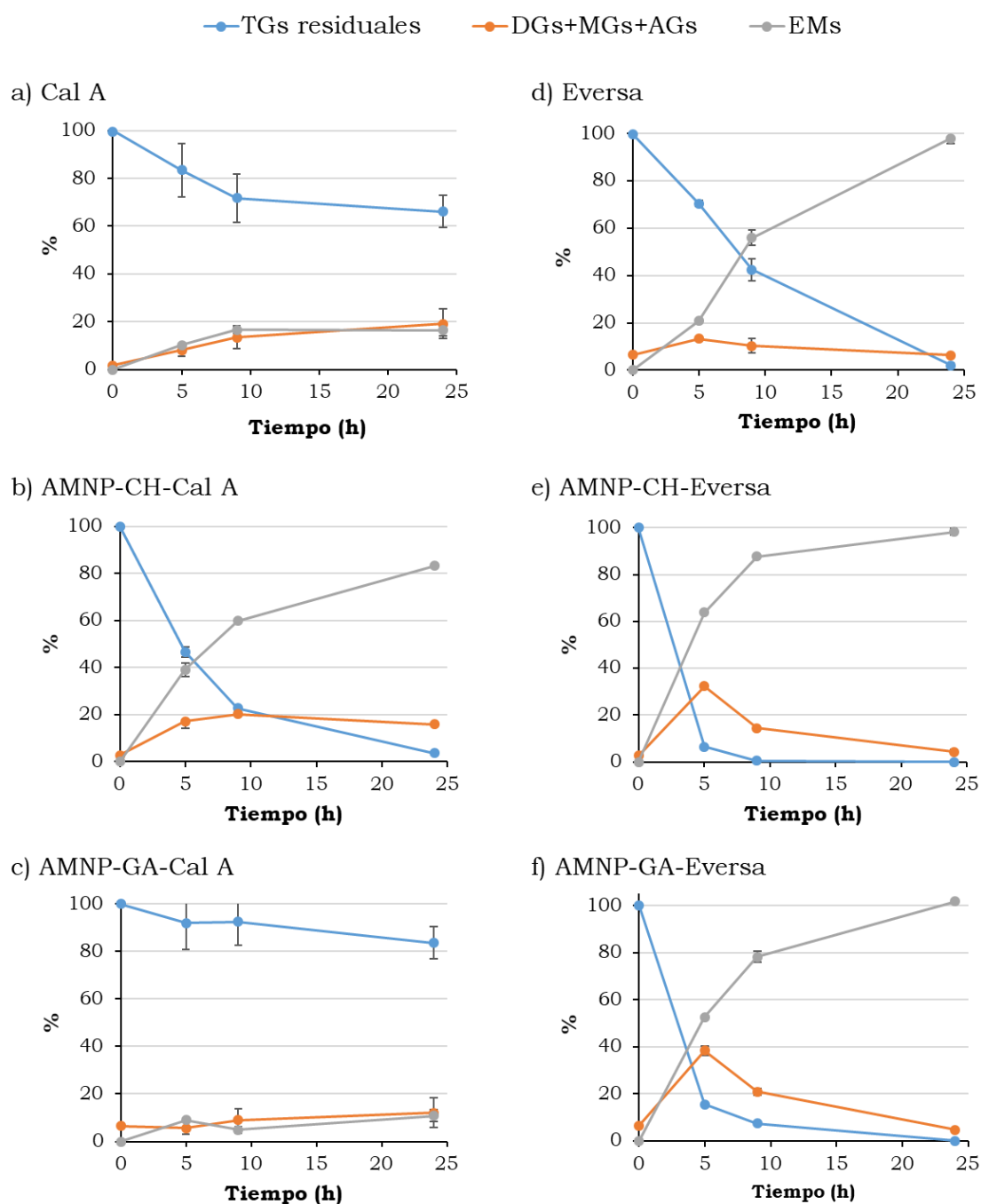


Figura 4.28. Evolución en el tiempo de la transesterificación enzimática de aceite de cocina reciclado y metanol los nanobiocatalizadores de las enzimas Cal A® (a-c) y Eversa® (d-f). Las reacciones se desarrollaron a 25 °C, con una agitación rotatoria de 100 rpm, una relación aceite:metanol de 1:4 y 100 mg de cada nanobiocatalizador.

Muchas publicaciones describen la aplicación de Eversa® soluble en síntesis de biodiesel pero, al ser una enzima de bajo coste, el interés en su inmovilización es limitado y solo hay un

trabajo que emplea la enzima inmovilizada para este fin (Remonatto *et al.*, 2018). Estos autores evalúan la actividad de Eversa inmovilizada sobre cuatro soportes hidrofóbicos observando la conversión total del aceite en ésteres metílicos en tiempos cortos. Un segundo trabajo (Arana-Peña *et al.*, 2018) habla de la inmovilización no covalente de Eversa en perlas de agarosa funcionalizadas con grupos octilo o aminadas aunque se limitan a valorar su actividad en hidrólisis de varios ésteres. Por tanto, en esta Tesis se han sintetizado por primera vez catalizadores covalentes con Eversa.

#### **4.5.3. Comparación de la eficiencia en síntesis de biodiesel de todos los catalizadores**

Con la excepción de Cal B<sup>®</sup>, que ni en su forma libre ni inmovilizada muestra actividad de síntesis de EMs, en las condiciones suaves de reacción que hemos empleado, la inmovilización de las otras lipasas mejoró su actividad catalítica. Comenzando por las enzimas libres, Cal A<sup>®</sup> y OPEr sintetizaron alrededor del 20% de biodiesel mientras que, como era de esperar, Eversa<sup>®</sup> fue la única que produce estos compuestos de manera eficiente en las condiciones ensayadas, siendo el mejor catalizador para sintetizar biodiesel de los cuatro evaluados en esta Tesis.

Las tres lipasas inmovilizadas como AMNP-CH- sintetizaron más del 83% de EMs en 24 h (Figuras 4.27 b y 4.28 b y e). La preparación de Eversa<sup>®</sup> fue mucho más rápida que con la enzima soluble y de los dos catalizadores de Cal A<sup>®</sup>, esta versión fue la más activa en esta reacción. Las preparaciones AG1-CH- y AG4-CH- de OPEr fueron menos eficientes, con rendimientos del 75% en 24 h para AG1-CH-OPEr (Tabla 4.13) y <20% con AG4-CH-OPEr (Tabla Anexo II h). Los malos datos de síntesis de biodiesel con este nanobiocatalizador contrastan con su eficiencia en la producción de ésteres de ácidos grasos volátiles (Figura 4.20). Esto demuestra que una determinada combinación enzima/soporte/estrategia de inmovilización afecta a la actividad catalítica de la enzima, haciendo que sea viable o no como



catalizador de una determinada reacción. No hemos encontrado referentes en la literatura para las preparaciones en las que se utilizan las cadenas glucídicas oxidadas de las lipasas para inmovilizarlas sobre soportes aminados, puesto que este procedimiento de inmovilización se usa con poca frecuencia, y nunca se había ensayado con lipasas.

Los nanobiocatalizadores AMNP-GA- de OPEr y Cal A® no fueron muy eficientes: OPEr hidrolizó el 60% de los triglicéridos y produjo un 50% de ésteres metílicos, y AMNP-GA-Cal A no alcanzó el 80% de degradación de TGs (Figura 4.27 c y 4.28 c). Ya se han explicado anteriormente las razones que justifican la baja eficiencia de estas preparaciones. Sin embargo, AMNP-GA-Eversa transformó totalmente el sustrato (98% de biodiesel) a una velocidad similar a la de su otra preparación covalente. Remonatto *et al.* (2018) reportaron un resultado similar para la alcoholisis de aceite de girasol catalizada por Eversa® inmovilizada por adsorción. Si bien es cierto que el tiempo de reacción indicado en dicho trabajo fue de solo 3 h, las condiciones aplicadas presumiblemente contribuyen a mejorar la velocidad de la reacción: hexano como cosolvente, 40 °C y ausencia total de agua. En cuanto al catalizador AG1-GA-OPEr, los porcentajes de síntesis fueron ligeramente inferiores, pero comparables a los de AMNP-CH-OPEr (Figura 4.27 g). La bibliografía describe ensayos de síntesis de biodiesel sobre nanopartículas activadas con GA. Por ejemplo, Xie y Ma (2009) produjeron EMs mediante transesterificación de aceite de soja con metanol catalizada por la lipasa de *T. lanuginosus* inmovilizada en AMNP-GA, con una conversión superior al 90% (30 h, 50 °C, metanol:aceite 3:1). Como ya hemos comentado, Miao *et al.* (2018) también obtuvieron 90% de biodiesel con Cal B® inmovilizada de este modo, lo que contrasta con los pésimos rendimientos obtenidos en nuestro ensayo con AMNP-GA-Cal B, que pueden deberse a las condiciones utilizadas en nuestro ensayo.

De entre los nanobiocatalizadores de OPEr, las mCLEAs-OPEr fueron las más activas. Desafortunadamente, el tiempo marcado



para la finalización de este trabajo no permitió inmovilizar las demás enzimas por este procedimiento, por lo que carecemos de datos para su comparación. La inmovilización de enzimas como mCLEAs es relativamente reciente, y hay pocos trabajos que describen el uso de lipasas insolubilizadas mediante este procedimiento para la síntesis de biodiesel. El primero de ellos, publicado por Cruz-Izquierdo *et al.* (2014), analizó la transesterificación de aceite con propanol catalizada por mCLEAs de Cal B®, con una productividad muy inferior (90% en 72 h, alcohol:aceite 6:1) a la de mCLEAs-OPeR. Varias lipasas se han inmovilizado como mCLEAs y aplicado en la síntesis de biodiesel, como las de *A. oryzae* ST11, *B. cepacia*, *Penicillium expansum* y *R. miehei*. En algunos de estos trabajos se ha utilizado aceite de cocina usado como sustrato (Badoei-dalfard *et al.*, 2019; Yang and Zhang, 2019), y en todos ellos la reacción tiene lugar con cosolvente y a mayor temperatura y el porcentaje (p/p) de catalizador es igual o superior al empleado en esta Tesis (20%) (Lai *et al.*, 2012; Paitaid and H-Kittikun, 2019; Zhang *et al.*, 2017).

Por último, el nanobiocatalizador no covalente, SiMAG-Octyl-OPeR también fue muy eficiente en esta reacción. No hay ningún trabajo que utilice un soporte magnético hidrofóbico para esta aplicación, pero sí muchos que estudian la metanolisis de aceites y grasas catalizada por Novozym 435 y otras lipasas, como las de *R. oryzae*, *M. miehei*, y *B. cepacia* con rendimientos variables (Norjannah *et al.*, 2016; Remonatto *et al.*, 2018, Salis *et al.*, 2005).

Como hemos visto, son numerosos los artículos publicados sobre el uso de lipasas inmovilizadas en diferentes soportes para la síntesis de biodiesel, utilizando o no cosolventes y sistemas de captura del agua, y en diversas condiciones y tiempos de reacción. La cantidad de biocatalizador empleada es también muy variable, y para lipasas inmovilizadas sobre AMNPs estos porcentajes suelen estar entre 17,3-40% (p/p) (Cruz-Izquierdo *et al.*, 2014). Esta disparidad de condiciones hace difícil la

comparación de los resultados descritos en la bibliografía con los de este trabajo.

#### **4.5.4. Reciclabilidad de los nanobiocatalizadores en la síntesis de biodiesel**

Los seis nanobiocatalizadores más activos en la producción de biodiesel fueron sometidos a hasta 9 ciclos sucesivos de reacción, para comprobar su estabilidad operacional. En los casos en los que se observó un descenso acusado de la actividad en la quinta reacción consecutiva, se detuvo el reciclado. En las Figuras 4.29 y 4.30 se representa el porcentaje de triglicéridos convertidos en cada ciclo de reacción.

Es interesante destacar que en el segundo ciclo de reacción (R2) todas las preparaciones de OPEr, a excepción de AG1-GA-OPEr, incrementaron ligeramente el rendimiento (Figura 4.29). En general, los nanobiocatalizadores magnéticos mantuvieron casi el 100% de su actividad de conversión al cabo de 9 ciclos de reacción (Figuras 4.29 a, c y d). La única preparación que experimentó una clara pérdida de actividad es AMNP-GA-OPEr (Figura 4.29 b), que deja de funcionar en el quinto ciclo (R5). Los nanobiocatalizadores con el soporte no magnético AG1 demostraron una buena estabilidad operacional (Figura 4.29 e-f) aunque, de nuevo, la pérdida de actividad fue superior para la inmovilización por glutaraldehído, AG1-GA-OPEr (70% actividad residual en R5), frente al 80% de actividad de AG1-CH-OPEr en el noveno ciclo (R9).

Por otra parte, las dos preparaciones covalentes de Eversa® y AMNP-CH-Cal A mantuvieron su actividad durante 9 ciclos de reacción (R9), confirmando su robustez (Figura 4.30). Por lo tanto, podemos afirmar que la reciclabilidad de la mayoría de los nanobiocatalizadores estudiados en el presente trabajo es excelente.

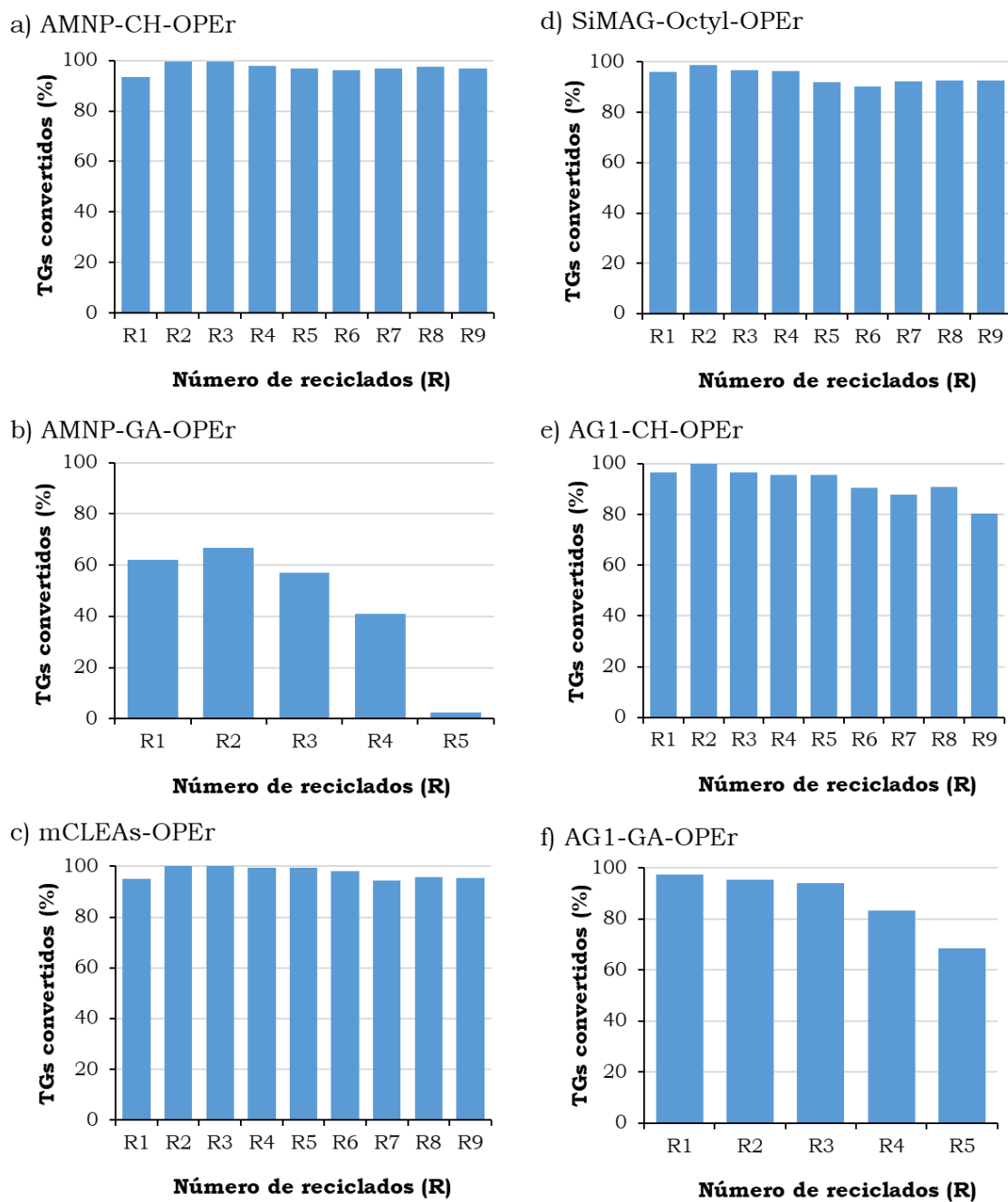


Figura 4.29. Estabilidad operacional de los nanobiocatalizadores de OPER en nueve ciclos consecutivos de transesterificación, utilizando aceite de cocina usado y metanol. Se muestran los valores de TGs convertidos al cabo de 24 h para cada ciclo de reacción.

No existe bibliografía que describa la estabilidad operacional de Cal A<sup>®</sup> inmovilizada en esta reacción. Solo un trabajo describe el reciclado de esta enzima inmovilizada sobre MNPs-quitosano-GA en la esterificación directa de ácidos grasos de pescado con

2-etil-1-hexanol (Monteiro *et al.*, 2019). En este caso, la actividad residual de Cal A® desciende gradualmente hasta ser <50% en el octavo ciclo, mientras que nuestra preparación AMNP-CH-Cal A conserva más del 85% tras 9 ciclos de reacción. En cuanto a Eversa®, el estudio de Remonatto *et al.* (2018), realizado con la lipasa inmovilizada por adsorción, indica que mantuvo la actividad durante tres ciclos, y conservó el 75% en el cuarto. Por tanto, nuestros resultados con las dos preparaciones covalentes de Eversa® marcan una clara diferencia en cuanto a la reciclabilidad de esta enzima tras su inmovilización.

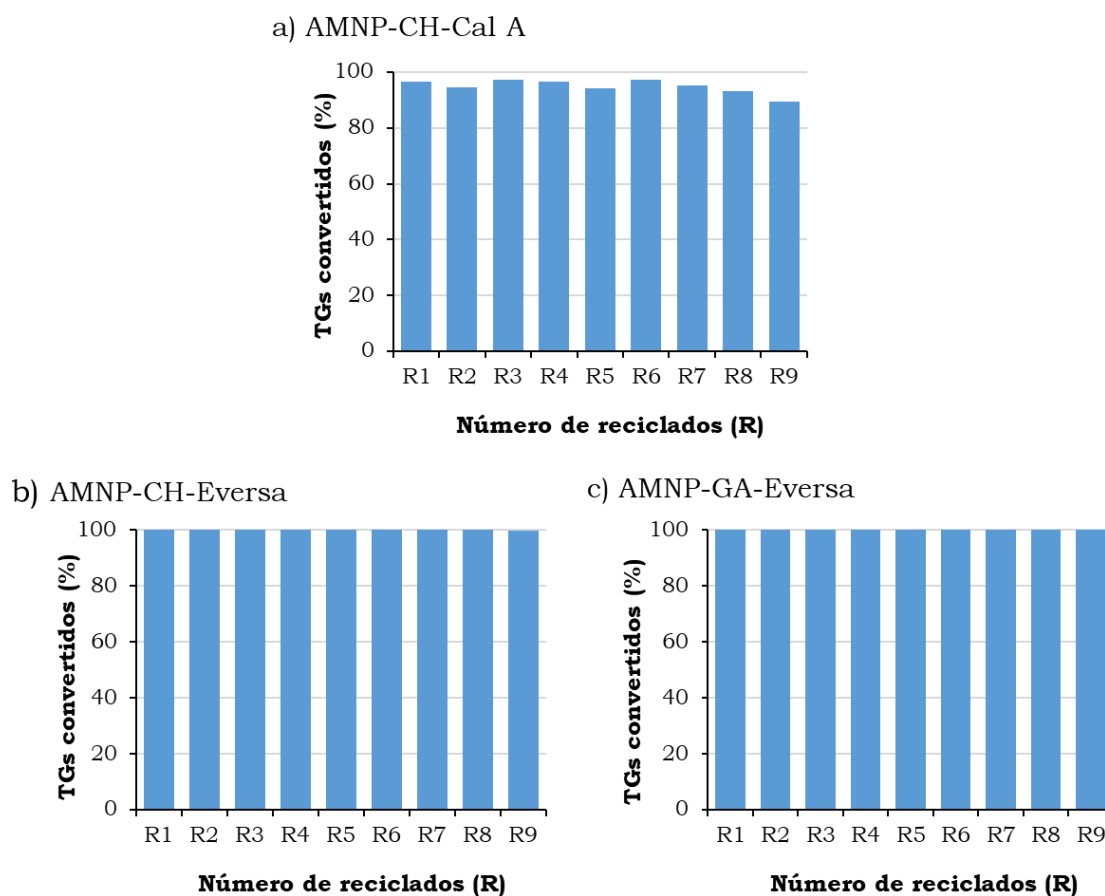


Figura 4.30. Estabilidad operacional de los nanobiocatalizadores de Cal A® (a) y Eversa® (b-c) más eficientes, a través de nueve ciclos de transesterificación con aceite de cocina reciclado y metanol. Se muestran los valores de TGs convertidos al cabo de 24 h para cada ciclo de reacción.

Wang *et al.* (2009) investigaron la reutilización de las lipasas de *C. rugosa*, *B. cepacia* y de páncreas porcino en la síntesis de biodiesel observando que la actividad residual después de 9 ciclos de reacción es inferior al 30%. Para Lipozyme-TL<sup>®</sup> inmovilizada sobre AMNP-GA- la actividad se redujo al 50% en 5 ciclos (Xie and Ma, 2009) y al 70% para Cal B<sup>®</sup> (Miao *et al.*, 2018). Sin embargo, Cruz-Izquierdo *et al.* (2014) describen el mantenimiento de la actividad de mCLEAs de Cal B<sup>®</sup> en síntesis de ésteres propílicos, pero reduciendo el tiempo de reacción de 72 a 24 h, a costa de un rendimiento menor. Por otro lado, la lipasa de *R. miehei* inmovilizada como mCLEAs retuvo el 84% de su actividad inicial después de 5 usos (Zhang *et al.*, 2017).

Una vez analizadas las reacciones a tiempo final, podemos detenernos a hacer algunas consideraciones sobre su curso, según se suceden los ciclos de síntesis. Respecto a OPEr, la primera observación es que los DGs empiezan a acumularse (Tablas Anexo II a-ñ), y el momento en que esto sucede depende del nanobiocatalizador: a partir del cuarto ciclo (R4), con AMNP-CH-OPEr, del quinto (R5) con mCLEAs-OPEr y del séptimo (R7) con AG1-CH-OPEr y SiMAG-Octyl-OPEr (Tablas Anexo II b, d f y e respectivamente). En los nanobiocatalizadores en los que la enzima se une al soporte funcionalizado con grupos aldehído (AMNP-GA-OPEr y AG1-GA-OPEr), el porcentaje de DGs que se acumula aumenta a partir del segundo ciclo (R2) (Tablas Anexo II c y g respectivamente). En algunos casos, como mCLEAs-OPEr y AG1-CH-OPEr, también aumenta el porcentaje de AGs residuales. El análisis por GC/MS reveló que, en todos los casos, estos diglicéridos eran 1,3-dioleil-glicerol y 1-palmitoil-3-oleil-glicerol, derivados de los dos principales triglicéridos del aceite de oliva (Galeano Diaz *et al.*, 2005). Este hallazgo confirma una suposición previa, basada en datos cristalográficos, sobre cómo se acomodan los triglicéridos en el túnel interno de la OPEr (Gutiérrez-Fernández *et al.*, 2014). Según esta hipótesis, la cadena alifática central del TG (posición *sn*-2) entraría en el túnel hidrofóbico de la lipasa OPEr (Figura 4.31) hasta el punto en que el enlace éster alcanza la Ser de la triada catalítica, liberando un

diglicérido 1,3. La acumulación de estos dos 1,3-diglicéridos lo corrobora, e identifica una preferencia de la lipasa versátil OPEr por la posición *sn*-2 de los triglicéridos, lo que la hace muy similar a Cal A<sup>®</sup> en este sentido (Kirk and Christensen, 2002).

Con AMNP-CH-Cal A se observa un aumento en la producción de EMs y un descenso de la acumulación de AGs a partir del segundo ciclo (R2) (Tabla Anexo II k). Debido al excelente rendimiento de los nanobiocatalizadores de Eversa<sup>®</sup>, no se observó una acumulación muy significativa de subproductos (DGs, MGs y AGs) a lo largo de los reciclados (Tabla Anexo II n-ñ).

En el Anexo III se presenta una Tabla resumen de los rendimientos de síntesis ésteres metílicos obtenidos con todos los nanobiocatalizadores utilizados, en el primer y último ciclo de reacción.

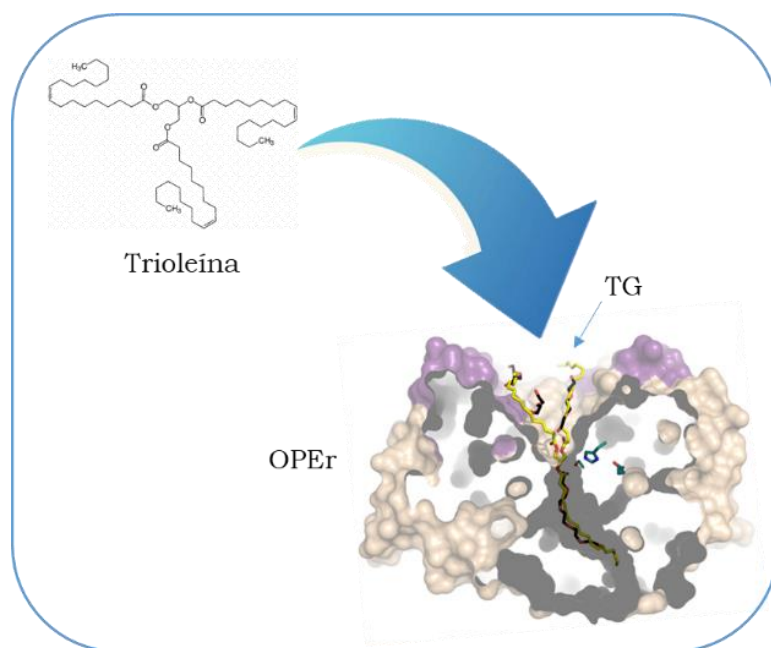


Figura 4.31 Acoplamiento de un TG, como la trioleína, en la enzima OPEr durante el proceso de hidrólisis. Se observa como el ácido graso en posición *sn*-2 se acopla en el centro activo, en forma de túnel, para comenzar la hidrólisis. Adaptada de Gutiérrez-Fernández *et al.* (2014).

#### 4.5.5. Escalabilidad de la reacción

Todas las reacciones anteriores se realizaron en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ , que es un tamaño manejable para probar la eficiencia y las propiedades generales de la batería de nanobiocatalizadores sintetizados. Aún a nivel de laboratorio, preparamos uno de los catalizadores inmovilizados en mayor cantidad y repetimos el proceso de metanolisis a una escala mayor, con el fin de comprobar si se mantenía el buen comportamiento catalítico y el sencillo manejo de la reacción a lo largo de todo el proceso. Siendo OPEr el objeto de esta Tesis, seleccionamos AMNP-CH-OPEr como catalizador para este experimento por tener eficiencia y reciclabilidad comparables a las de las formas inmovilizadas de Eversa® y por ser un procedimiento de inmovilización menos convencional que los restantes. Primero, aumentamos 10 veces la producción del nanobiocatalizador, uniendo 200 mg de OPEr (previamente tratada para generar aldehídos en sus cadenas glucídicas) a 10 g de AMNPs. Aunque no se detectó actividad de lipasa en el sobrenadante tras la inmovilización, la actividad específica y la recuperación de actividad, determinadas para este lote, fueron algo inferiores a las de una reacción con 1 g de AMNPs y 20 mg de proteína, desarrollada en paralelo.

La reacción se culminó con éxito, ya que se logró una conversión completa de los triglicéridos en ésteres metílicos como producto principal (Figura 4.32). Como ocurrió a menor escala, hay una cantidad residual de ácidos grasos libres que no están metilados, lo cual puede deberse a una escasez de metanol, que probablemente se evapora en cada muestreo, debido a su volatilidad, como ya hemos comentado. Esta reacción se repitió tres veces consecutivas, con escasa pérdida de actividad.



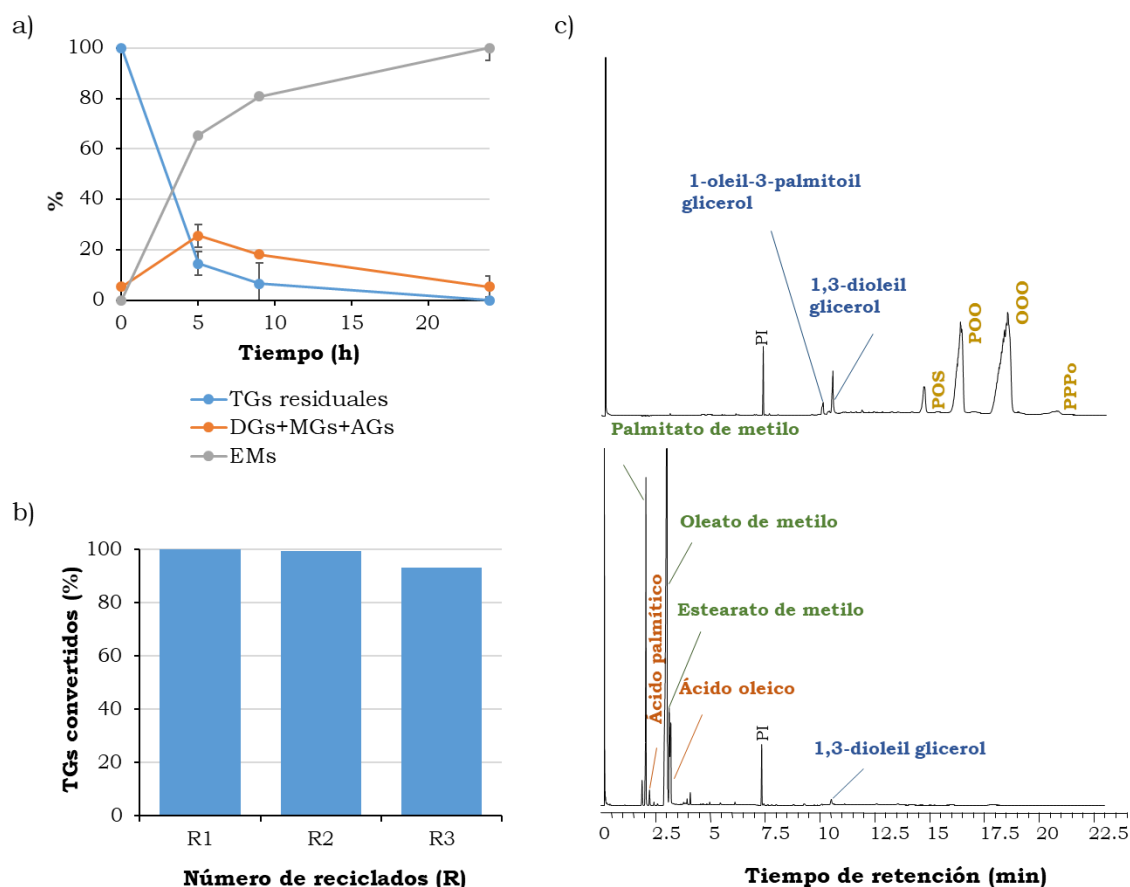


Figura 4.32. a) Transesterificación enzimática de 25 mL de aceite de cocina reciclado y metanol (25 °C, 100 rpm, aceite:metanol 1:4, 5 g AMNP-CH-OPeR); b) Reciclabilidad de AMNP-CH-OPeR en reacciones de 24 h; c) Cromatogramas de la mezcla de reacción a 0 h (gráfico superior) y 24 h (gráfico inferior). OOO: trioleína; POO: palmitodioleína; POS: 1-palmitoil, 2-oleil, 3-estearoil glicerol; PPPo: palmitoleildipalmitina.

#### 4.6. Síntesis de ésteres de $\beta$ -sitoestanol

Los esteroides vegetales y sus derivados son compuestos ampliamente utilizados como nutraceuticos, y generalmente se incluyen en matrices alimentarias grasas, como margarinas y yogur. Por su similitud estructural con el colesterol, compiten con él en la unión a la proteína transportadora LDL (lipoproteína de baja densidad) y, por tanto, reducen su absorción. No obstante, es conocido que los ésteres de fitoesteroides y ácidos grasos de cadena larga tienen mayor efecto que su precursor no



esterificado, probablemente por su mayor solubilidad en grasas y biodisponibilidad (Cusack *et al.*, 2013). Igualmente, la bibliografía describe que los fitoestanoles y sus ésteres (formas saturadas de los fitoesteroles) son más eficientes en el control del colesterol sérico. De hecho, preparados comerciales como Benecol® incorporan estanoles esterificados en su fórmula, obtenidos mediante hidrogenación química de los fitoesteroles (Thompson and Grundy, 2005).

Los esteroides son sustratos difíciles para reacciones enzimáticas por su estructura molecular, muy voluminosa y con grupos OH poco accesibles, y pocos catalizadores han demostrado ser apropiados para esta reacción. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se había comprobado que OPE y OPEr eran mucho más eficientes que la lipasa de *C. rugosa* utilizada (CRL) catalizando la esterificación directa de una mezcla de fitosteroides de soja, con los ácidos oleico o láurico, en condiciones de reacción suaves (28 °C e isooctano como cosolvente). Estos estudios se recogieron en una patente de aplicación (Cedillo *et al.*, 2013), en la que se analizó el efecto del tipo de cosolvente, la dosis de enzima, y la proporción donador:aceptor sobre el rendimiento de síntesis de ésteres. Sin embargo, no se había realizado ningún ensayo con estanoles, por lo que elegimos el  $\beta$ -sitoestanol como compuesto modelo para analizar el potencial de síntesis enzimática de sus ésteres láurico y oleico.

Al inicio de este trabajo, apenas habíamos comenzado los experimentos de inmovilización de lipasas, por lo que los ensayos iniciales para la puesta a punto de esta aplicación se realizaron utilizando enzimas solubles como biocatalizadores y abordando la síntesis enzimática de este tipo de ésteres mediante dos procedimientos: esterificación directa y transesterificación.

#### 4.6.1. Esterificación directa de $\beta$ -sitoestanol catalizada por lipasas solubles

En una primera aproximación, utilizamos para esta reacción las condiciones óptimas determinadas por Barba Cedillo *et al.* (2013) para la síntesis de ésteres de fitoesteres: un sistema bifásico isooctano/agua (<10% de agua), una proporción equimolar de los sustratos y 3 U/mL del cóctel de lipasa de *C. rugosa* (CRL), OPE u OPEr, analizando los productos tras 24 y 48 h de reacción. Las tres enzimas lograron catalizar la esterificación directa del  $\beta$ -sitoestanol en las condiciones ensayadas (Figura 4.33), pero la eficiencia de OPE y OPEr fue superior a la de CRL tal y como se había observado previamente para los fitoesteres (Cedillo *et al.*, 2013). Tomando muestras a tiempos más cortos, se comprobó que la tasa de esterificación de OPEr en los primeros 30 min era muy alta (60-80%, ácido oleico-ácido láurico), y que en solo 3 h la esterificación llegaba al 90% (Figura 4.33 c), mientras que esto no ocurría en las reacciones catalizadas por OPE y menos aún con CRL, cuyo rendimiento máximo fue del 34% para el éster láurico y del 75% para el éster oleico tras 96 h.

CRL y OPE son más eficientes en la síntesis del éster oleico que para el éster láurico (Figura 4.33 a y b), sin embargo, la longitud de la cadena del ácido graso no parece influir de manera significativa en el rendimiento de OPEr (Figura 4.33 c).

Las diferencias de actividad en función de la longitud de la cadena acilada y/o del grado de insaturación son frecuentes entre las lipasas y esterasas (He *et al.*, 2010). Sin embargo,, Panpipat *et al.* (2013) describieron que Cal A<sup>®</sup> sintetiza los ésteres C8 y C18 del  $\beta$ -sitostanol con rendimientos parecidos, lo que vuelve a indicar un comportamiento similar al de OPEr. No obstante, la reacción catalizada por OPEr se desarrolla a una temperatura más baja (28 °C *vs.* 50 °C) y en tiempos más cortos (3 h *vs.* 6 h).

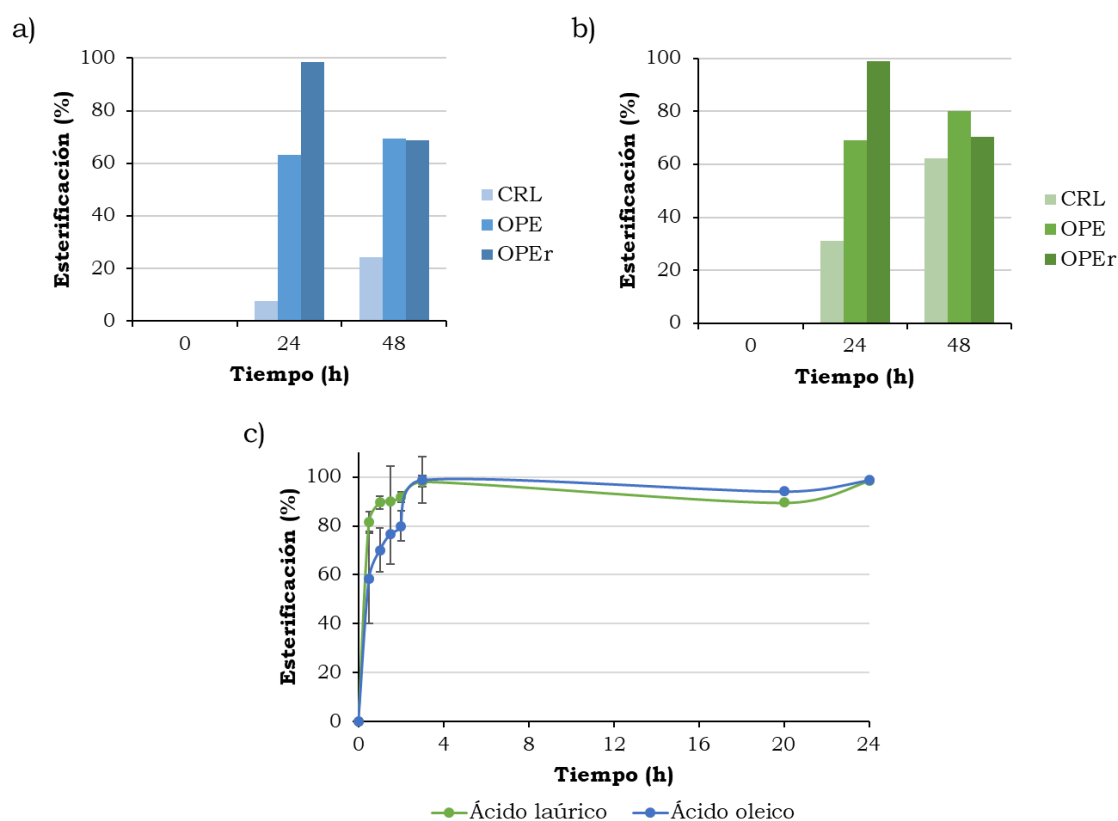


Figura 4.33. Eficacia de CRL, OPE y OPEr en la esterificación directa de  $\beta$ -sitoestanol con: a) ácido láurico y b) ácido oleico. c) Detalle de las primeras 24 h de reacciones catalizadas por OPEr. Las reacciones se llevaron a cabo a 28 °C y 1.200 rpm con isooctano como cosolvente.

La Figura 4.34 muestra cromatogramas representativos del progreso de la esterificación de  $\beta$ -sitoestanol con los ácidos láurico y oleico catalizada por OPEr, al inicio (0 h) y a las 2 h de reacción. Se observa la disminución del pico de  $\beta$ -sitoestanol y la aparición de un nuevo pico, correspondiente al éster correspondiente, como producto único de reacción, con tiempo de retención de 12,4 min para el laurato de sitostanilo y de 13,9 min para el oleato de sitostanilo.

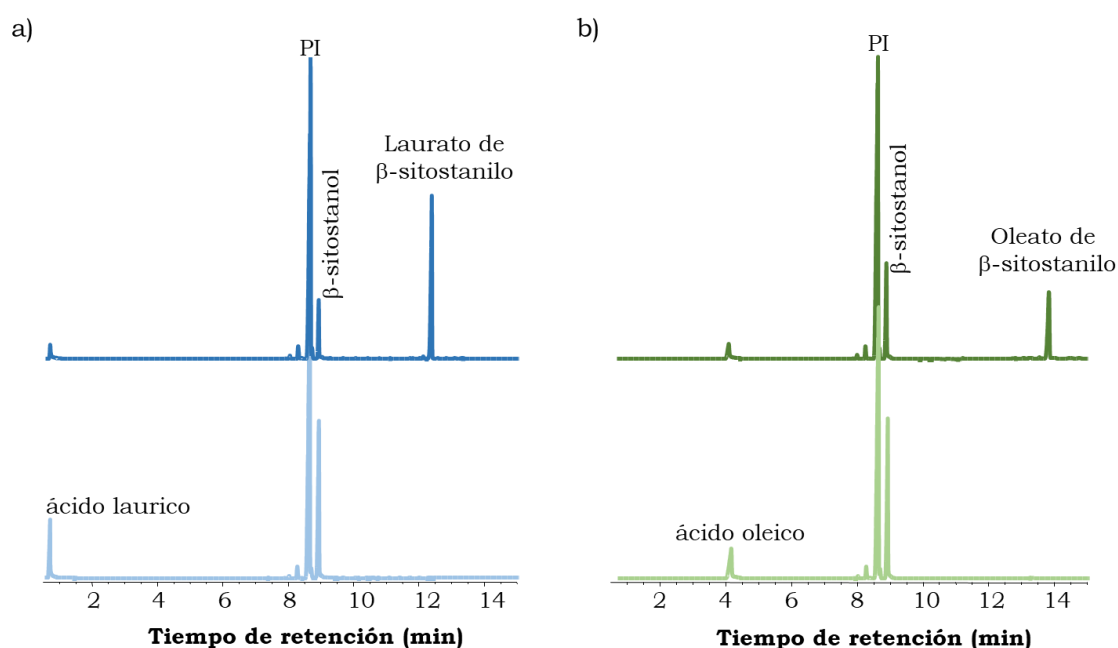


Figura 4.34. Cromatogramas de GC que muestran el progreso de la esterificación directa (reacciones de 0 h abajo y 2 h arriba) del  $\beta$ -sitoestanol con: a) ácido láurico y b) ácido oleico.

La formación del éster se demostró también mediante FTIR (Figura 4.35). La banda a  $1044\text{ cm}^{-1}$ , característica de la absorción de los grupos  $-\text{OH}$  del  $\beta$ -sitoestanol, desaparece en el espectro de los productos que, a su vez, muestran dos bandas estrechas a  $1737$  y  $1171\text{ cm}^{-1}$  atribuibles a la absorción del grupo carbonilo de los ésteres (Parker, 1971).

Además de las lipasas de *C. rugosa*, se han descrito otras enzimas con actividad lipasa/esterol esterasa, de diferentes orígenes, y se ha evaluado la síntesis enzimática de ésteres de esteroles con distintas enzimas (Kim and Akoh, 2007). He *et al.* (2010) compararon la eficacia de varias enzimas libres e inmovilizadas en la esterificación de estanoles.

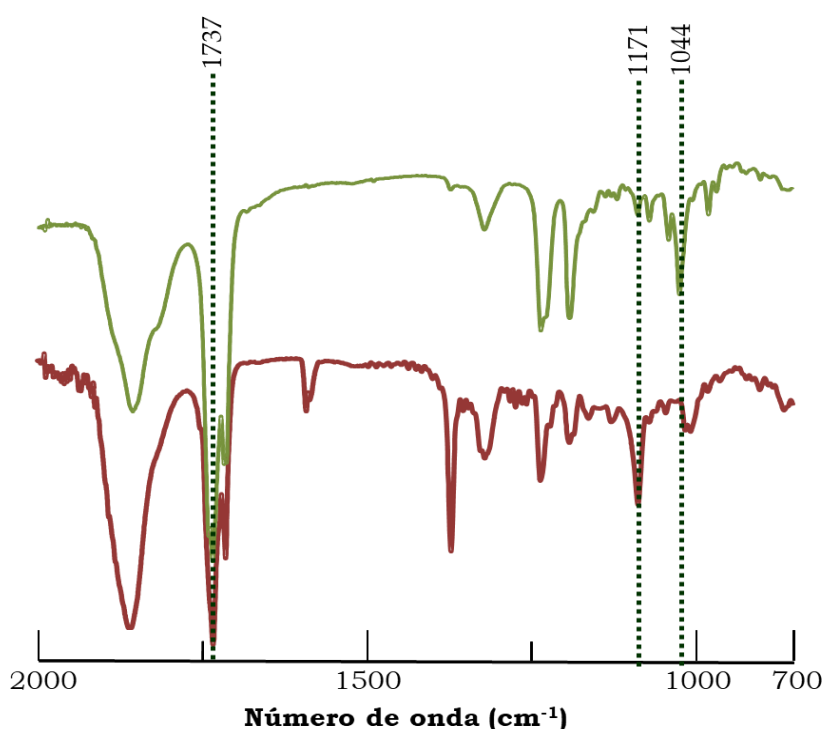


Figura 4.35. Región de los espectros FTIR (2000-700  $\text{cm}^{-1}$ ) de  $\beta$ -sitoestanol (verde) y  $\beta$ -oleato de  $\beta$ -sitoestanol (rojo).

Entre las enzimas microbianas, los mejores resultados (33%) se lograron con Novozym 435<sup>®</sup>. El trabajo de Panpipat *et al.* (2013) compara la actividad de lipasas Cal A<sup>®</sup>, Cal B<sup>®</sup> y TLL<sup>®</sup>, inmovilizadas. De entre ellas, Cal A<sup>®</sup> es la más eficiente en esta reacción (>93% esterificación en 6-24 h, 40-50 °C, proporción molar 1:1). Hakalin *et al.* (2018) compararon Cal A<sup>®</sup>, Cal B<sup>®</sup> y OPEr en la esterificación directa de  $\beta$ -sitoestanol con ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, obteniendo buenos resultados con Cal A<sup>®</sup> y OPEr. Sin embargo, no se detectaron productos con Cal B<sup>®</sup>. Con la lipasa de *Candida* sp. el grado de esterificación llega a una meseta o disminuye ligeramente a proporciones molares de ácidos grasos superiores a 1:2 (Pan *et al.*, 2012) o 1:3 (Villeneuve *et al.*, 2005).

Resumiendo, los datos aquí presentados y la información recopilada de la literatura evidencian que OPEr es mejor catalizador que otras lipasas para la síntesis de ésteres de  $\beta$ -

sitoestanol mediante esterificación directa, con altos rendimientos en tiempos cortos (3 h) a 28 °C.

#### **4.6.1.1.Efecto de la relación molar de los sustratos**

Como ya se ha mencionado, las reacciones catalizadas por lipasas y esteroles esterasas son reversibles, y la proporción molar de los sustratos es un parámetro clave que determina la dirección y el equilibrio de la reacción (He *et al.*, 2010; Kim and Akoh, 2007; Miao *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2011). Por ello, se estudió el efecto de excesos molares moderados (1:3) o altos (1:6) del ácido graso sobre las reacciones catalizadas por las tres enzimas (Figura 4.36).

OPEr. En reacciones catalizadas por OPEr, el grado de esterificación a las 20 h de reacción fue comparable al detectado en reacciones equimolares (Figura 4.36 a). Sin embargo, a tiempos cortos, la velocidad de esterificación fue menor cuando la mezcla de reacción contenía un exceso molar de ácido graso. El grado de esterificación del ácido láurico a los 30 minutos de reacción fue de aproximadamente un 45% con las proporciones 1:3 o 1:6, frente al 80% de esterificación detectada en reacciones equimolares (Figura 3.35 a, abajo) y el del ácido oleico 55% en mezclas 1:1 y 1:3 y un 10% más bajo con el exceso 1:6. Esto sugiere que OPEr se inhibe parcialmente cuando se expone a altas concentraciones de estos ácidos.

OPE. A diferencia de los resultados observados para OPEr, la OPE nativa no se inhibe por exceso de los ácidos láurico u oleico (Figura 4.36 c-d). De hecho, la presencia de un exceso moderado de ácidos grasos mejoró el rendimiento final de esterificación con respecto a las reacciones equimolares.

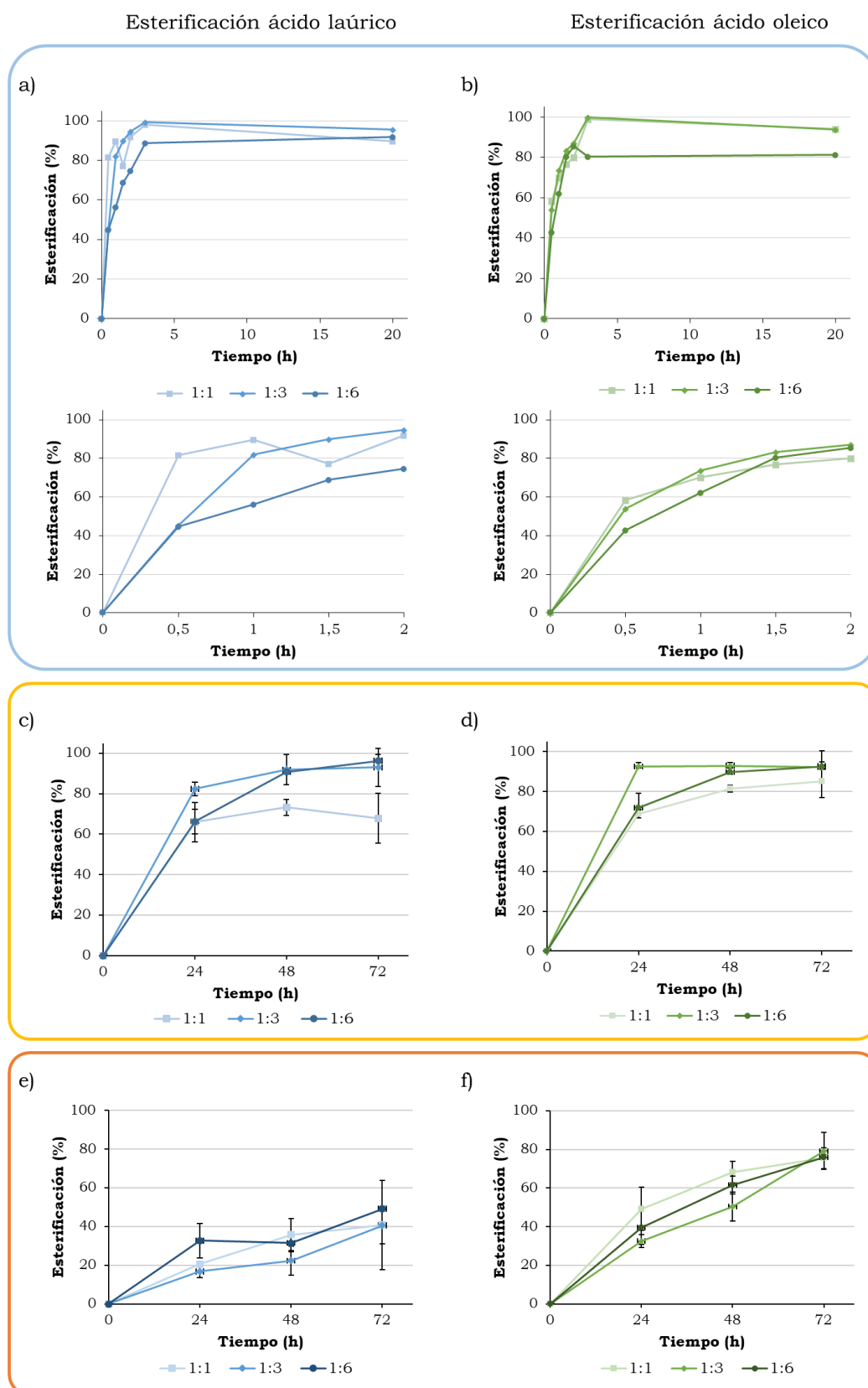


Figura 4.36. Curso de las reacciones de esterificación directa de  $\beta$ -sitoestanol con distintas proporciones molares de ácido láurico (izquierda) y oleico (derecha), catalizada por: a-b) OPeR (arriba, 24 h; abajo, detalle 2 primeras horas); c-d) OPE (72 h); e-f) CRL (72 h).

La cinética de la esterificación en presencia de excesos de los donadores fue similar a la de la reacción equimolar durante las primeras 24 h, pero después de este período siguió evolucionando para dar un máximo de alrededor del 95% de laurato y oleato de  $\beta$ -sitostanilo.

CRL. En las condiciones de reacción ensayadas, la síntesis de ambos ésteres catalizada por CRL dio lugar a bajos rendimientos a tiempos de reacción cortos, cualquiera que fuera su proporción, pero el ácido láurico demostró ser peor sustrato que el ácido oleico (Figura 4.36 e-f). Tras 72 h de reacción se produjo un 76% de oleato de  $\beta$ -sitostanilo y sólo 40-50% de laurato de  $\beta$ -sitostanilo. Sin embargo, varios trabajos describen la preferencia de la lipasa de *C. rugosa* por sustratos de cadena media frente a los de cadena larga (Miao *et al.*, 2014; Vu *et al.*, 2004). Kim and Akoh (2007) describieron la optimización de la esterificación de una mezcla de fitoesteres con ácido oleico, catalizada por CRL, con rendimientos del 97% (19 h, 51,3 °C y proporción molar 1:2,1). Otros trabajos indican que la tasa de esterificación del  $\beta$ -sitoestanol se incrementa drásticamente usando excesos molares de ácido oleico de hasta 1:5, en reacciones sin cosolvente, catalizadas por CRL (Weber *et al.*, 2001b). En todo caso, es conveniente ser cauteloso al comparar resultados obtenidos con CRL por diferentes autores. Como se ha comentado previamente, esta levadura produce varias isoenzimas con más, menos, o ninguna actividad frente a ésteres de esteroides y en los trabajos consultados no se detalla qué isoenzima predominante contiene la preparación utilizada.

#### **4.6.2. Transesterificación $\beta$ -sitoestanol catalizada por lipasas solubles**

En primer lugar, se estudió la transesterificación de  $\beta$ -sitoestanol y oleato de metilo (proporciones 1:1, 1:3 o 1:6) en isooctano, catalizada por las tres enzimas (Figura 4.37 a-c panel superior).



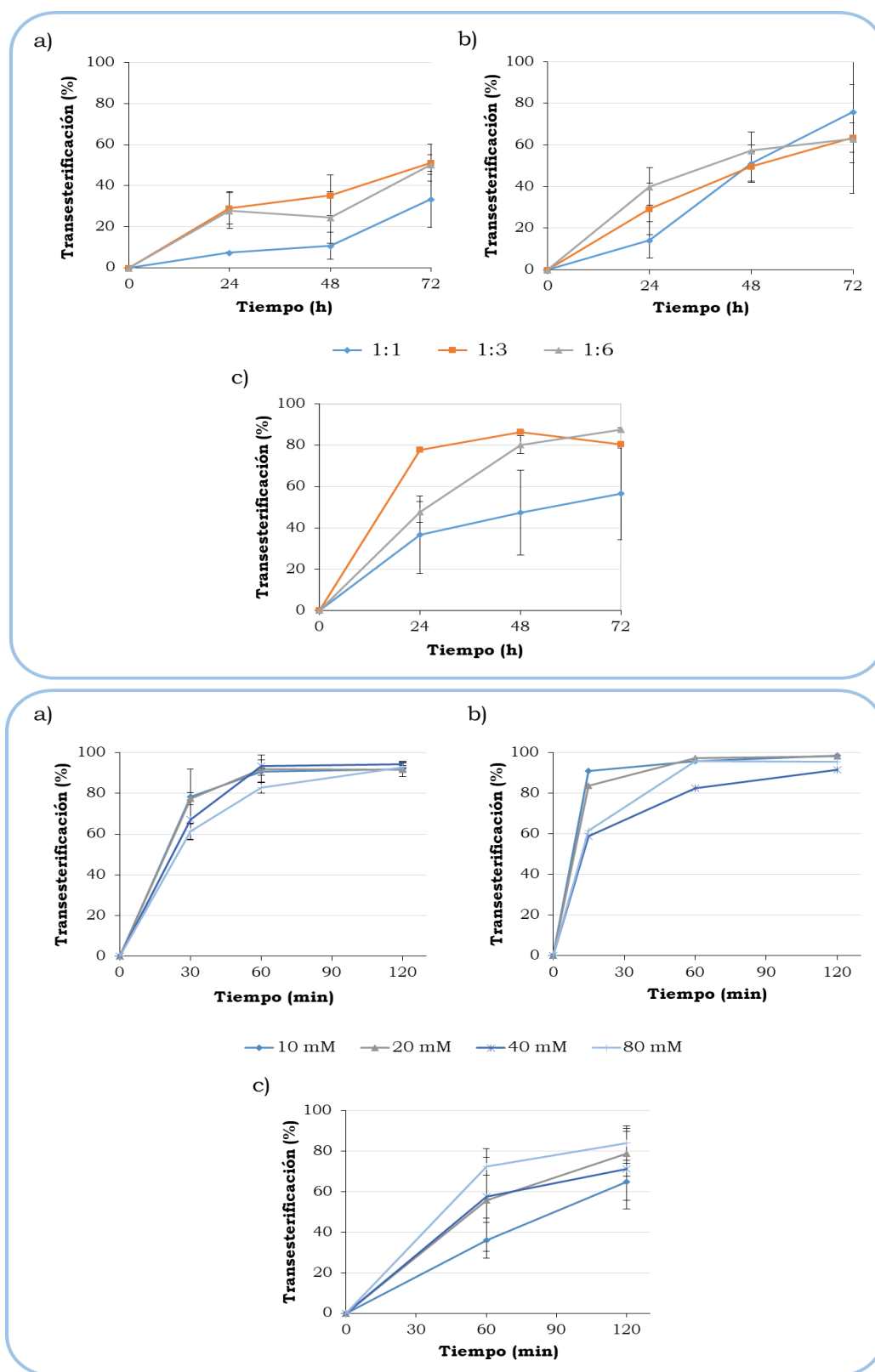


Figura 4.37. Transesterificación de  $\square$ -sitoestanol con oleato de metilo, con y sin cosolvente, en reacciones catalizadas por: a) OPEr, b) OPE, y c) CRL. Panel superior: Reacciones con isooctano como cosolvente. Panel inferior: Reacciones sin cosolvente. Todos los experimentos se realizaron a 28 °C y 1.200 rpm.

Las reacciones transcurrieron lentamente y, en general, los rendimientos fueron bajos en condiciones equimolares. Sin embargo, la síntesis catalizada por OPE y OPEr mejoró en presencia de excesos del donador, lo que sugiere que favorece la transesterificación.

En un trabajo realizado en paralelo en nuestro laboratorio, se ensayó la transesterificación de cantidades equimolares (10 mM) de oleato de metilo y  $\beta$ -sitoestanol catalizada por OPEr, y otras enzimas fúngicas de la familia *Candida rugosa-like*, incluyendo la lipasa comercial de *C. rugosa*, en ausencia de cosolvente, observando que los resultados eran mejores en estas condiciones (Vaquero *et al.*, 2016).

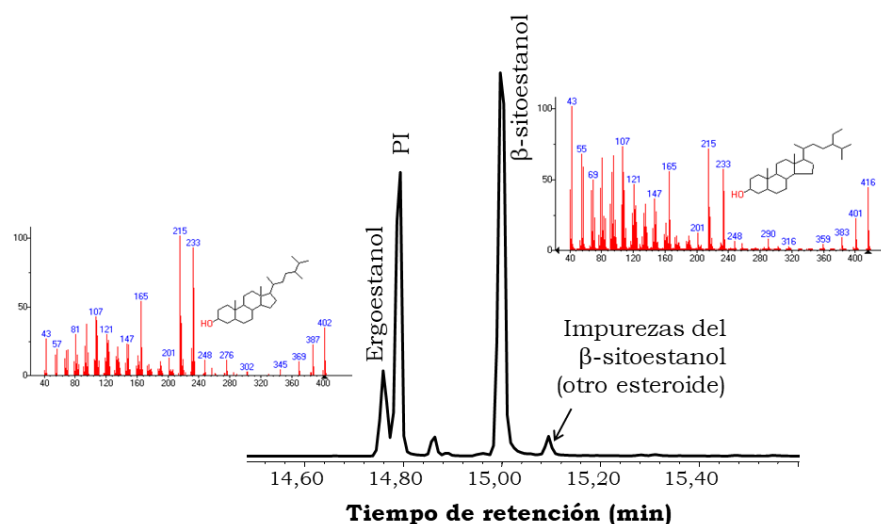
Por tanto, preparamos reacciones sin isooctano, en las que el oleato de metilo funciona como solvente y como donador de acilos y, aprovechando la buena solubilidad del  $\beta$ -sitoestanol en oleato de metilo, utilizamos concentraciones de  $\beta$ -sitoestanol hasta 80 mM. Los resultados, presentados en la Figura 4.37 (panel inferior), indican que ninguna de las enzimas experimentaba inhibición por exceso de sustrato en estas condiciones, y los rendimientos fueron excelentes con los tres catalizadores. Hay que destacar que las dos formas de OPE, nativa y recombinante, esterificaron entre el 83-95% del  $\beta$ -sitoestanol ofrecido como sustrato en 2 h a todas las concentraciones. Así, en la más concentrada, se obtuvo cerca de 80 mM de oleato de sitostanilo en ese corto periodo de tiempo. Los rendimientos con CRL mejoraron en las reacciones sin cosolvente, pero sin llegar a los de OPE u OPEr.

#### **4.6.3. Transesterificación de $\beta$ -sitoestanol catalizada por los nanobiocatalizadores de OPEr**

Una vez comprobado que OPEr era la enzima más eficiente sintetizando ésteres de  $\beta$ -sitoestanol mediante transesterificación sin cosolvente, se evaluó la actividad y reciclabilidad de la batería de nanobiocatalizadores-OPEr

preparados en esta Tesis. Para este estudio, se aplicaron inicialmente las condiciones más favorables definidas en el experimento anterior: 80 mM de  $\beta$ -sitoestanol en oleato de metilo y 20% de fase acuosa. Es interesante comentar que al analizar un nuevo lote del sustrato comercial  $\beta$ -sitoestanol utilizado en este momento del trabajo, se observó que contenía un 80% de  $\beta$ -sitoestanol y un segundo componente que fue identificado como ergoestanol en base a su espectro de masas, utilizando la librería NIST 2011 incluida en el software GC/MS (Figura 4.38).

a)



b)

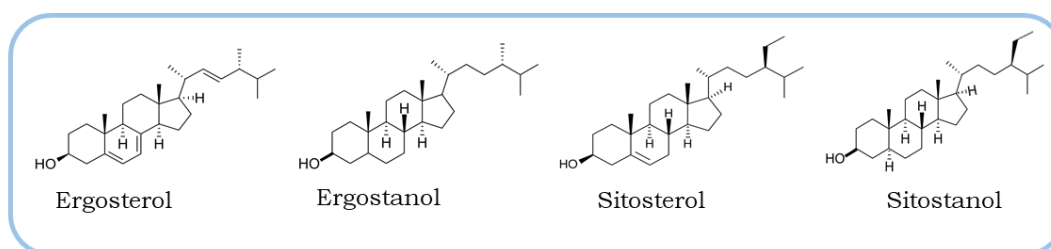


Figura 4.38 a) Cromatograma GC/MS del  $\beta$ -sitoestanol y ergoestanol y espectros de masas de los dos compuestos. b) Representación química de ergosterol y sitosterol y sus formas saturadas, ergostanol y sitostanol.

Ambos estanoles se transformaron en su correspondiente éster oleico (Figura 4.39) utilizando OPEr soluble o inmovilizada como catalizador de la transesterificación, demostrando que la

actividad y la amplia especificidad del sustrato de la enzima se mantiene en los nanobiocatalizadores.

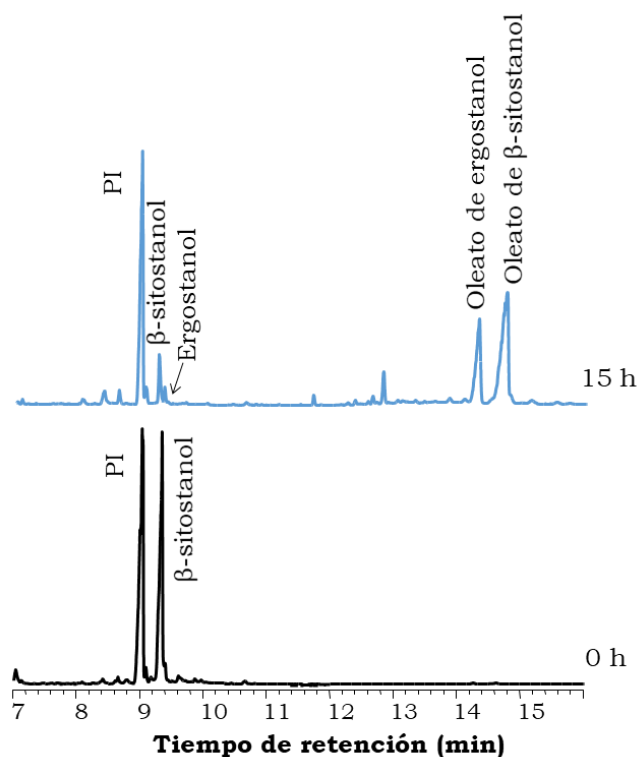


Figura 4.39. Cromatogramas (GC) de las muestras analizadas a las 0 h y a las 15 h, mostrando el progreso de la transesterificación y la síntesis de los ésteres de estanol.

En la Figura 4.40 se muestran los rendimientos de transesterificación (los valores corresponden a la suma de ambos ésteres), a tiempo final, en reacciones catalizadas por OPEr y sus nanobiocatalizadores. En este ciclo inicial, solo OPEr libre y SiMAG-Octyl-OPEr produjeron un buen rendimiento de esterificación (86% y 72%, respectivamente), mientras que con los demás catalizadores oscilaron entre un 18-60%, en esta primera reacción.

Los rendimientos de transesterificación a lo largo de varios ciclos de reacción se representan en la Figura 4.41. Empezando con los datos obtenidos para las preparaciones con soporte magnético (Figura 4.41 a), se observa que la eficiencia de las

preparaciones mejoró notablemente en el segundo (R2) y tercer (R3) ciclo, llegando a valores estables de conversión a partir del cuarto (R4), del orden del 90% en 15 h. En vista de estos resultados, se tomaron muestras para el análisis a las 2 h en los ciclos de reacción R4 y R5 (Figura 4.41 b), comprobando que, tanto con el nanobiocatalizador no covalente SiMAG-Octyl-OPeR como con la enzima covalentemente ligada a través de sus cadenas de azúcar (AMNP-CH-OPeR), el porcentaje de transesterificación se acercaba mucho a los valores máximos producidos en 15 h en los ciclos anteriores. En estos dos últimos ciclos de reacción, la actividad catalítica de AMNP-CH-OPeR supera de manera modesta pero significativa a la de la preparación no covalente.

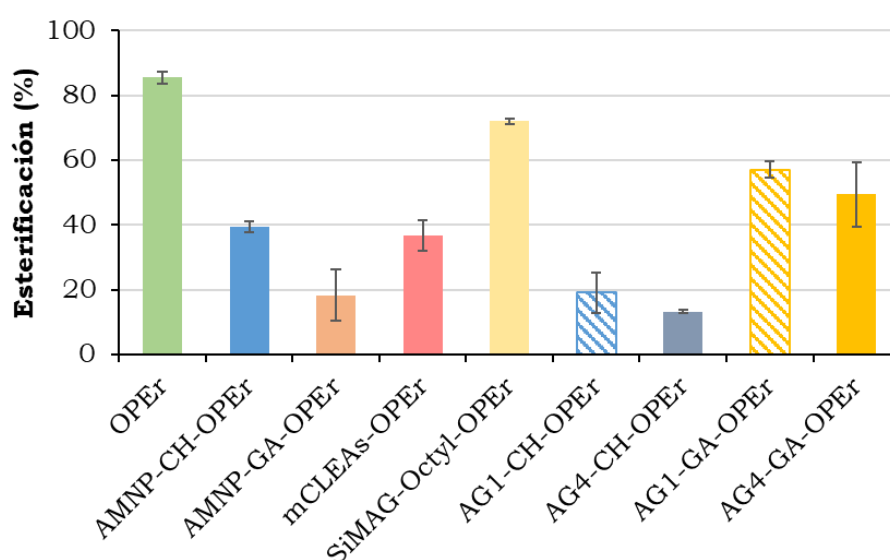


Figura 4.40. Rendimiento de la transesterificación de  $\beta$ -sitoestanol y oleato de metilo catalizada por OPeR y sus nanobiocatalizadores.

Como hemos comentado en las aplicaciones anteriores, se puede atribuir la excelente actividad de estas dos preparaciones a que ambas mantienen una estructura más flexible tras su inmovilización, facilitando el acceso de estos sustratos tan voluminosos al centro activo, y permitiendo la adaptación de la enzima a las condiciones de reacción. El mayor grado de libertad

de la enzima en la preparación SiMAG-Octyl-OPeR es, probablemente, el responsable del elevado rendimiento obtenido con este catalizador desde el primer ciclo (R1). En cuanto al incremento de la actividad de las preparaciones inmovilizadas tras su primer uso, ya habíamos observado este fenómeno en las reacciones de síntesis de biodiesel, aunque en esta aplicación es mucho más evidente. Aunque no hemos encontrado una explicación concluyente de por qué ocurre esta mejora del rendimiento de esterificación tras los reciclados, podemos pensar que la presencia de cantidades residuales de componentes del ciclo de reacción anterior ejerce un efecto beneficioso en la siguiente.

Comparando estos resultados con los descritos en la sección 4.6.1, para las reacciones con enzimas solubles, podemos concluir que los rendimientos de AMNP-CH-OPeR y SiMAG-Octyl-OPeR en los ciclos R4 y R5, a las 2 h, son comparables a los obtenidos con OPeR y OPe libres a tiempos similares. Sin embargo, los nanobiocatalizadores pueden recuperarse fácilmente de la mezcla de reacción, facilitando la separación del producto, y reutilizarse en la misma reacción.

Finalmente, en la Figura 4.41 c, se representa la eficiencia en 15 h y reciclabilidad (3 ciclos) en esta reacción de los nanobiocatalizadores no magnéticos, preparados sobre los soportes AG1 y AG4. Vemos nuevamente el efecto positivo de la reutilización de la enzima, que cataliza conversiones próximas al 80% en el tercer ciclo. Es interesante destacar el buen porcentaje de esterificación alcanzado con ambos catalizadores AG4, que se iguala a los AG1 y los AMNP covalentes en esta reacción.

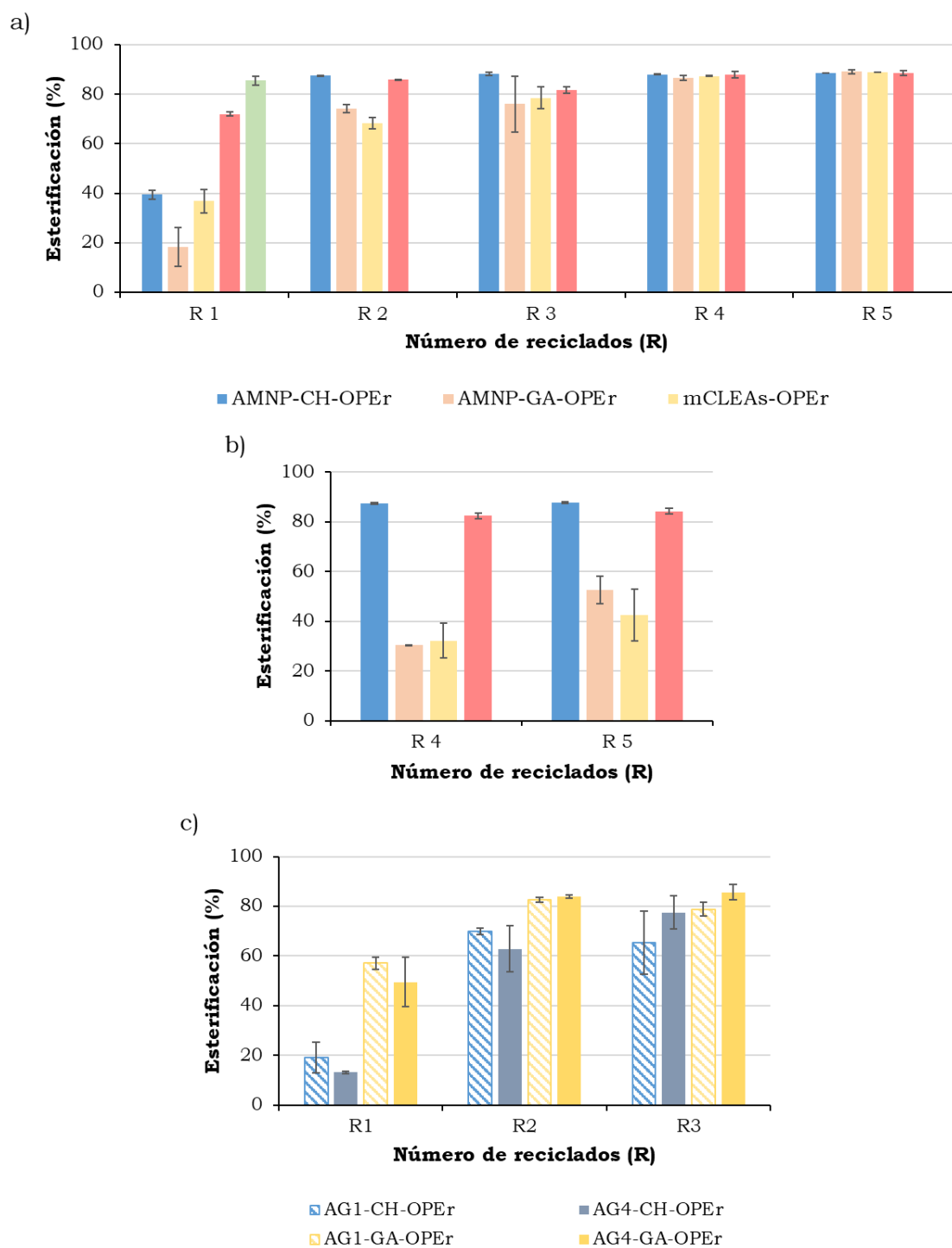


Figura 4.41. Estabilidad operacional de OPER y sus nanobiocatalizadores en la transesterificación de  $\beta$ -sitoestanol y oleato de metilo. a) Rendimiento de ésteres con los catalizadores con soporte magnético (15 h). b) Detalle de los rendimientos al cabo de 2 h en los ciclos de reacción R4 y R5. c) Rendimiento de ésteres con los nanobiocatalizadores sobre soporte no magnético (15 h).

En las otras dos aplicaciones estudiadas en esta tesis, los resultados obtenidos con las lipasas inmovilizadas sobre este soporte han sido dispares. En la esterificación directa de 1-butanol y VFAs, estos dos nanobiocatalizadores actuaron eficientemente sobre todos los sustratos ensayados, produciendo los ésteres C4-C7 de forma comparable a las demás preparaciones inmovilizadas. Sin embargo, cuando se ensayaron para síntesis de biodiesel, los rendimientos fueron tan bajos que se descartó su uso en esta aplicación. A la vista de los resultados obtenidos en la síntesis de los ésteres de estanoles se puede especular que tal vez su actividad se habría incrementado en ciclos posteriores, si se hubiera reciclado.

Poniendo en contexto estos resultados con los reportados para otras lipasas inmovilizadas, encontramos varios trabajos que abordan ese tema. La lipasa de *C. rugosa*, inmovilizada en diferentes soportes, cataliza reacciones de esterificación y/o transesterificación, generalmente en presencia de cosolvente, en un rango de temperatura entre 35-55 °C durante 6-24 h (Shang *et al.*, 2015; M.-M. Zheng *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013; M. M. Zheng *et al.*, 2012). Los rendimientos de síntesis llegan hasta más del 90% en alguno de los casos y la reciclabilidad, si se evalúa, varía entre el mantenimiento casi completo de la eficiencia catalítica después de varios ciclos hasta su pérdida, después de 5 ciclos. Otras lipasas comerciales, inmovilizadas no covalentemente y probadas para esta aplicación, son Novozym 435®, Lipozyme RM-IM® y Lipozyme TL-IM®, pero su eficiencia es menor que la determinada para la lipasa comercializada de *C. rugosa* (He *et al.*, 2017; Miao *et al.*, 2014).

#### **4.6.4. Reacciones en cascada para la síntesis de ésteres de estanol a partir de metanol y aceite**

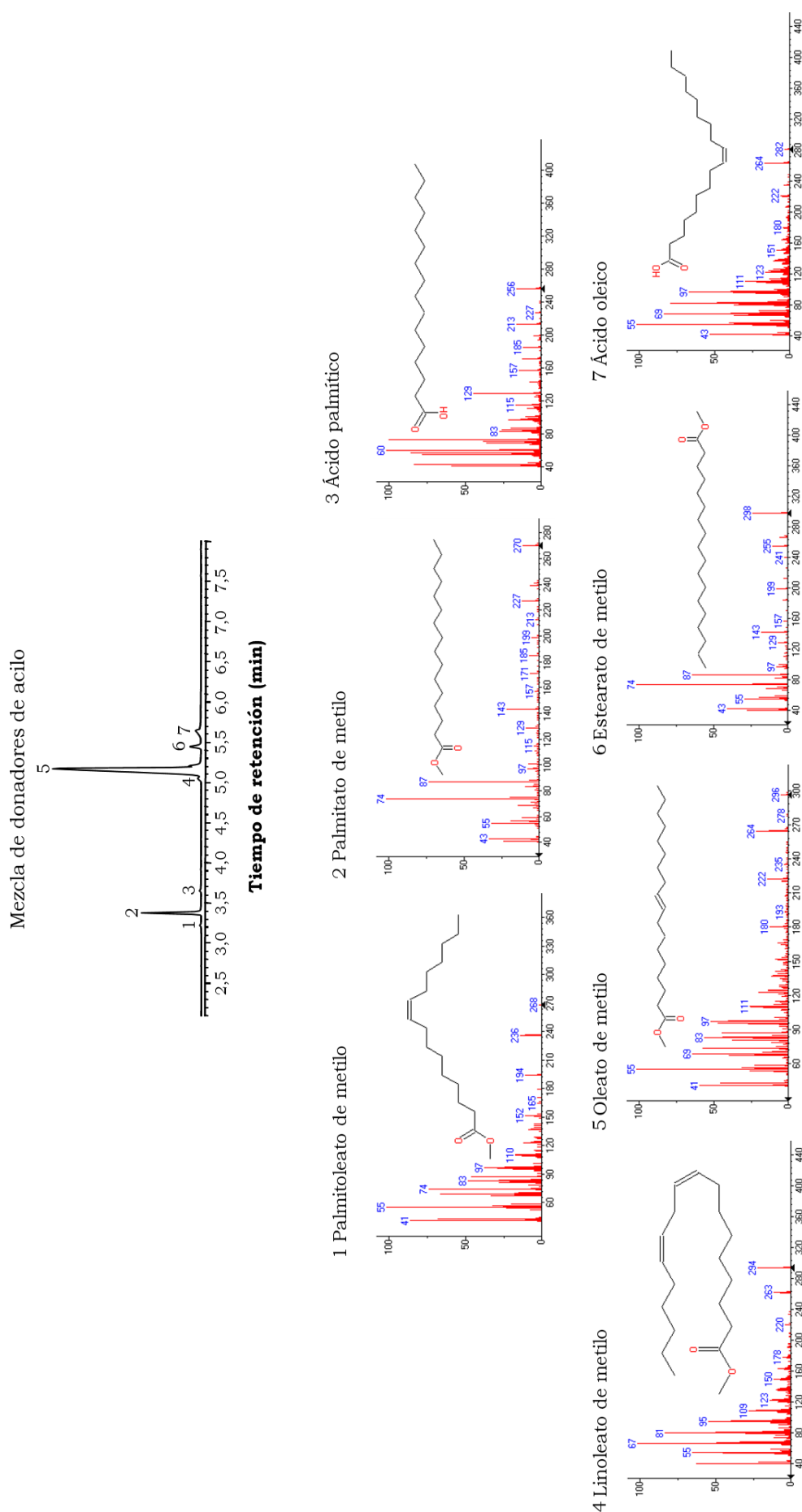
Por último, aunando dos de las aplicaciones descritas en esta Tesis, se ensayó la viabilidad de producir los ésteres de  $\beta$ -sitoestanol a partir de dos sustratos de bajo coste, metanol y aceite de cocina usado y desechado, utilizando una única enzima como catalizador. La reacción comprendería dos reacciones en



cascada, sintetizando ésteres metílicos en un primer paso (como se describe en la sección 3.13.2), para luego utilizarlos como solvente y donadores de acilo en la transesterificación de  $\beta$ -sitoestanol. De entre las preparaciones inmovilizadas de OPEr se seleccionó AMNP-CH-OPEr por su alta eficiencia en ambas reacciones (Figuras 4.27 b y 4.41 a y b).

Como productos de la primera reacción de transesterificación (24 h) encontramos 96,6% de ésteres metílicos, 1% de diglicéridos y 2,4% de ácidos grasos libres. Los ésteres metílicos producidos se identificaron por GC/MS como palmitoleato, palmitato, linoleato, oleato y estearato de metilo, con el oleato de metilo como componente principal (Figura 4.42). Todos estos compuestos son sustratos potenciales para el segundo paso catalítico, que implica la síntesis de los ésteres de estanol.

Una vez recuperada la mezcla de ésteres metílicos, se mezcló con la cantidad de  $\beta$ -sitoestanol necesaria para una concentración final de 80 mM, iniciando la transesterificación con el mismo nanobiocatalizador. Se analizaron muestras tras 2 y 15 h, observando una disminución del contenido en ésteres metílicos, diglicéridos y estanoles libres, un aumento de los picos de ácidos grasos, y la aparición de cuatro picos correspondientes a diferentes ésteres de  $\beta$ -sitoestanol (Figura 4.43).



La Figura 4.43 b muestra un detalle de los picos de los ésteres formados, correspondientes a oleato, palmitato, estearato y linoleato de  $\beta$ -sitostanilo. En el primer ciclo, la reacción alcanzó el rendimiento máximo de esterificación (85%) después de 15 h (datos no mostrados), siendo este valor un 45% superior al obtenido con oleato de metilo comercial como sustrato (Figura 4.41 a). Además, la velocidad de reacción aumentó drásticamente en los ciclos sucesivos, sintetizando alrededor del 80% de los ésteres de estanol en sólo 2 h, a partir del segundo ciclo (Figura 4.44). Esta observación confirma que, más que perder actividad, este catalizador gana eficiencia cuando se recicla. Estos datos son corroborados por el aumento en la cantidad de AGs, debido a la hidrólisis de EMs, y de DGs residuales (la hidrólisis de este compuesto no se observa en el primer ciclo), que se mantienen entre el R2-R5 (Tabla Anexo IV).

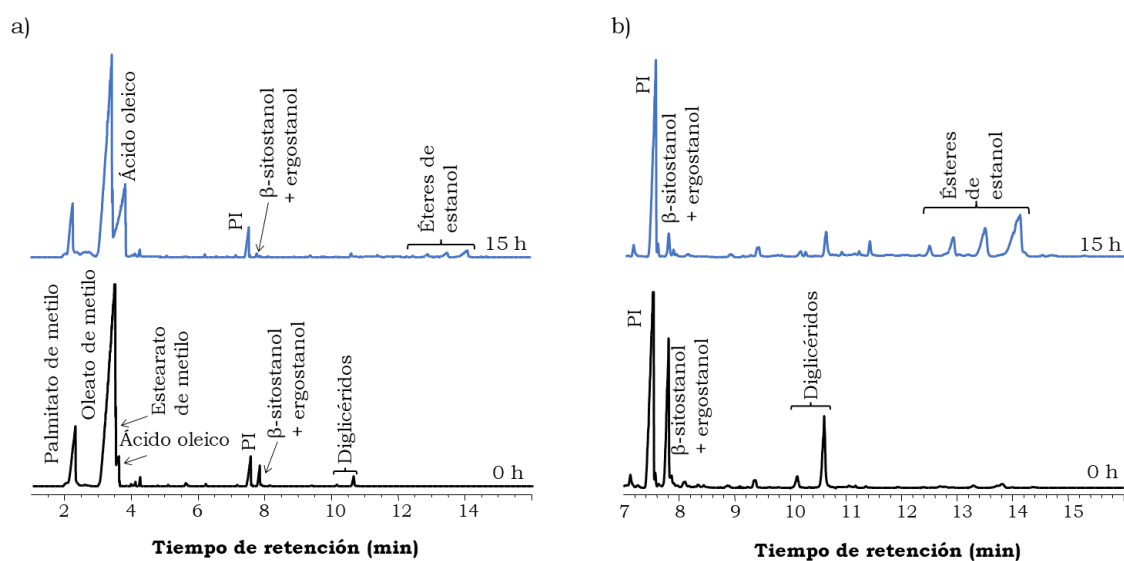


Figura 4.43. Cromatogramas (GC) de las muestras analizadas a las 0 h y a las 15 h, mostrando el progreso de la transesterificación y la síntesis de los ésteres de estanol. a) Cromatograma completo. b) Detalle de la región en la que eluyen el  $\beta$ -sitostanol y los productos.

Por tanto, los resultados apuntan a la idoneidad de esta nueva estrategia para sintetizar los ésteres de estanol mediante un procedimiento ecológico a partir de sustratos baratos, en el marco del concepto de economía circular. El nanobiocatalizador fue reciclado sin disminuir su eficiencia (alrededor del 80%) durante cinco reutilizaciones (Figura 4.44).

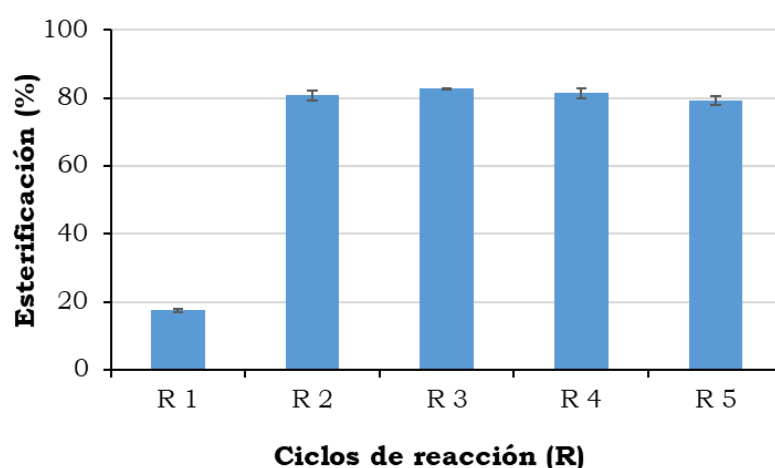


Figura 4.44. Rendimientos y reciclabilidad de la esterificación de  $\beta$ -sitoestanol producido mediante la reacción en cascada catalizada por AMNP-CH-OPeR en 2 h.

La síntesis enzimática de ésteres de estanol utilizando triglicéridos o mezclas de FAMES de origen vegetal (no sintetizados enzimáticamente) como donantes de acilo ha sido descrita por Zheng *et al.* (2012b). En este caso, el catalizador fue inmovilizado no covalentemente y las conversiones fueron buenas, pero su reciclabilidad no fue probada y las reacciones se realizaron a 55 °C y con un alto contenido en isooctano como cosolvente, condiciones mucho menos respetuosas con el medio ambiente que las utilizadas en el presente trabajo.

## ***5. Conclusiones***



1. Se han obtenido ocho nuevos nanobiocatalizadores tras inmovilizar la lipasa versátil de *O. piceae*, expresada en *P. pastoris* (OPeR). La inmovilización se realizó sobre nanopartículas, silanizadas y funcionalizadas, de magnetita o de dos nuevos óxidos mixtos de Zn/Mn. La proteína se ancló covalentemente a los soportes utilizando estrategias que involucran diferentes regiones de la proteína, y no covalentemente sobre un soporte magnético hidrofóbico.
2. La estabilidad a pH y temperatura de OPeR en un medio acuoso mejoró notablemente tras su inmovilización y las preparaciones mantuvieron entre el 80-100% de la actividad en hidrólisis de *p*NPB, tras 6-8 meses de almacenamiento a 4 °C, demostrando su elevada estabilidad.
3. OPeR catalizó la esterificación directa, en isooctano, de los ácidos grasos lineales butírico, valérico, hexanoico y heptanoico, y de los ramificados isobutírico e isovalérico con 1-butanol. Las reacciones se desarrollaron a 25 °C, con una proporción ácido:alcohol 1:2. AMNP-GA-OPeR y AMNP-CH-OPeR fueron los dos catalizadores más activos, con rendimientos cercanos al 100% a las 6 h de reacción. AMNP-GA-OPeR mantuvo constante su nivel de actividad a lo largo de siete ciclos de síntesis, demostrando su excelente estabilidad operacional en esta aplicación.
4. Se ha sintetizado biobiesel mediante transesterificación enzimática de aceite de cocina usado y metanol (1:4) en 24 h, a 25 °C y sin cosolvente. La robustez y eficiencia de OPeR en esta reacción mejoró notablemente en cinco de las preparaciones inmovilizadas, con rendimientos de síntesis de 75%-92%, siendo en los mejores casos, comparable al obtenido con Eversa®, la enzima comercial diseñada para esta aplicación. La estabilidad operacional de tres de los biocatalizadores fue excelente, manteniendo su eficiencia catalítica tras 9 ciclos sucesivos de 24 h, lo que sugiere que podrían reutilizarse en reacciones adicionales.

5. La transesterificación de  $\beta$ -sitostanol y oleato de metilo, catalizada por OPEr soluble a 25 °C y sin cosolvente, ha demostrado ser un procedimiento eficiente y limpio para producir estos ésteres de alto valor nutracéutico. En estas condiciones de reacción, la actividad de los nanobiocatalizadores en el primer ciclo fue mucho menor que la de la enzima soluble, aumentando en los dos siguientes ciclos hasta equipararse con la de la enzima libre. Los rendimientos de esterificación fueron superiores al 80% en periodos de 2-15 h, manteniéndose en ciclos sucesivos.
6. Se ha comprobado que estos ésteres de estanol también pueden sintetizarse utilizando como sustratos aceite de cocina usado, metanol y  $\beta$ -sitoestanol y AMNP-CH-OPEr como único catalizador. En una primera etapa catalítica de 24 h, se produjo una mezcla de ésteres metílicos, que se empleó para esterificar los estanoles en una segunda fase de transesterificación de 2 h, con un rendimiento del 80%. La actividad catalítica se mantuvo durante 5 ciclos.
7. Los nanobiocatalizadores evaluados no liberan compuestos tóxicos al medio de reacción, abriendo el camino a la producción sostenible de productos de consumo humano que pueden ser sintetizados utilizando como sustratos materias primas secundarias, como la fracción lipídica de los residuos vegetales industriales o agrícolas.
8. En este trabajo se ha demostrado que la inmovilización de OPEr y otras enzimas comerciales, mejora su actividad catalítica y/o su estabilidad, y permite su reciclado, contribuyendo al diseño de bioprocesos limpios y sostenibles y a la reducción de sus costes. También se ha demostrado la gran influencia del soporte y del procedimiento de inmovilización en la eficiencia de la enzima en un bioproceso determinado.



## ***6. Anexos***



## Anexo I

### Nanobiocatalizadores y Aplicaciones

Nanobiocatalizadores utilizados para cada aplicación probada en esta Tesis, en negrita se señalan los mejores para cada aplicación.

Aplicación Biotecnológica	Nanobiocatalizadores utilizados		Nomenclatura	
	Soporte	Lipasa		
Síntesis ésteres de VFAs	AMNPs-GA-AG1-GA-AG4-GA-	OPEr	<b>AMNP-GA-OPEr</b> G1-GA-OPEr G4-GA-OPEr mCLEAs-OPEr	
		Cal A®	AMNP-GA-Cal A	
		Cal B®	<b>AMNP-GA-Cal B</b>	
	AMNPs-CH-AG1-CH-AG4-CH-	OPEr	<b>AMNP-CH-OPEr</b> G1-CH-OPEr G4-CH-OPEr	
		Cal A®	AMNP-CH- Cal A	
		Cal B®	<b>AMNP-CH- Cal B</b>	
	SiMAG-Octyl-	OPEr	SiMAG-Octyl-OPEr	
	Síntesis ésteres metílicos	AMNPs-GA-AG1-GA-AG4-GA-	OPEr	AMNP-GA-OPEr G1-GA-OPEr G4-GA-OPEr <b>mCLEAs-OPEr</b>
			Cal A®	AMNP-GA-Cal A
			Cal B®	AMNP-GA-Cal B
Eversa®			<b>AMNP-GA-Eversa</b>	
AMNPs-CH-AG1-CH-AG4-CH-		OPEr	<b>AMNP-CH-OPEr</b> G1-CH-OPEr G4-CH-OPEr	
		Cal A®	AMNP-CH- Cal A	
		Cal B®	AMNP-CH- Cal B	
		Eversa®	<b>AMNP-CH-Eversa</b>	
SiMAG-Octyl-		OPEr	SiMAG-Octyl-OPEr	
Síntesis ésteres de estanoles		AMNPs-GA-AG1-GA-AG4-GA-	OPEr	AMNP-GA-OPEr G1-GA-OPEr G4-GA-OPEr mCLEAs-OPEr
	AMNPs-CH-AG1-CH-AG4-CH-	<b>AMNP-CH-OPEr</b> G1-CH-OPEr G4-CH-OPEr		
	SiMAG-Octyl-	<b>SiMAG-Octyl-OPEr</b>		

## Anexo II

### Tablas rendimientos síntesis ésteres metílicos, reciclados

En cada tabla se muestra, para cada catalizador, los rendimientos obtenidos en las reacciones de síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos y la cantidad de sustratos y productos intermedios a las 24 h de reacción en cada ciclo de reacción.

Los % fueron calculados en base al % de TGs inicial. Los datos pertenecen a las 24 h de cada ciclo de reacción. Para los nanobiocatalizadores de Eversa<sup>®</sup>, los resultados a las 9 h fueron muy similares quedando entre un 10-20 % de TGs+DGs+MGs+AGs entre los ciclos R2 a R9.

TGs: triglicéridos; DGs: diglicéridos; MGs: monoglicéridos; AGs: ácidos grasos; EMs: ésteres metílicos.

a)

OPEr					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	76,0 ± 4,9	6,2 ± 0,1	0,1 ± 0	2,0 ± 0,3	20,0 ± 0,2

b)

AMNP-CH-OPEr					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	6,6 ± 1,1	10,2 ± 2,0	0,1 ± 0	3,4 ± 0,3	84,9 ± 4,2
R2	0,4 ± 0,3	0,7 ± 0,6	0,1 ± 0	2,3 ± 0,2	102,3 ± 1,7
R3	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,6	0,1 ± 0	3,8 ± 0,5	103,1 ± 3,1
R4	2,1 ± 0,9	5,1 ± 2,0	0,1 ± 0	1,4 ± 0,3	104,5 ± 2,3
R5	3,2 ± 1,9	8,6 ± 5,6	0,1 ± 0	2,8 ± 0,5	96,3 ± 0,5
R6	3,7 ± 0,4	11,3 ± 2,9	0,1 ± 0	1,9 ± 0,9	90,2 ± 1,9
R7	3,1 ± 1,8	10,5 ± 6,1	0,2 ± 0	9,5 ± 4,5	88,3 ± 0,0
R8	2,6 ± 0,8	7,5 ± 3,1	0,1 ± 0	3,9 ± 0,0	92,8 ± 10,8
R9	3,2 ± 1,7	7,1 ± 3,8	0,0 ± 0	2,6 ± 0,7	93,5 ± 0,0

c)

AMNP-GA-OPeR					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	38,1 ± 3,6	9,4 ± 0,5	1,3 ± 0,2	2,2 ± 0,7	50,0 ± 0,8
R2	33,1 ± 4,8	15,1 ± 0,6	4,9 ± 0,6	5,6 ± 0,5	45,5 ± 1,7
R3	43,0 ± 7,8	13,4 ± 2,7	3,2 ± 0,6	4,2 ± 0,4	39,9 ± 1,7
R4	58,9 ± 0,5	15,6 ± 1,4	3,0 ± 1,0	5,2 ± 0,7	20,8 ± 3,5
R5	97,6 ± 1,7	3,9 ± 0,8	0,2 ± 0,0	1,1 ± 0,2	0,0 ± 0,1

d)

mCLEAs-OPeR					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	4,0 ± 2,1	6,0 ± 4,7	0,1 ± 0,0	2,5 ± 0,1	92,2 ± 5,3
R2	1,2 ± 0,1	2,7 ± 0,1	0,1 ± 0,0	3,2 ± 0,7	101,1 ± 0,6
R3	3,1 ± 0,1	9,2 ± 0,6	0,1 ± 0,0	1,5 ± 0,4	94,1 ± 0,7
R4	3,6 ± 0,0	5,6 ± 0,5	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,6	94,2 ± 6,5
R5	7,9 ± 1,3	23,0 ± 3,1	0,1 ± 0,0	2,6 ± 0,2	73,3 ± 4,8
R6	9,7 ± 2,7	12,4 ± 4,8	0,1 ± 0,1	13,7 ± 0,0	63,3 ± 8,4
R7	7,7 ± 0,0	25,4 ± 7,6	0,1 ± 0,1	6,9 ± 0,6	66,6 ± 0,1
R8	7,4 ± 0,0	21,8 ± 4,6	0,1 ± 0,0	8,2 ± 2,8	68,4 ± 0,0
R9	7,5 ± 0,0	25,6 ± 5,5	0,1 ± 0,0	6,2 ± 1,6	66,9 ± 0,2

e)

SiMAG-Octyl-OPeR					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	4,9 ± 2,9	3,1 ± 1,2	0,2 ± 0,0	14,7 ± 0,9	83,6 ± 2,9
R2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	8,9 ± 1,2	92,4 ± 1,5
R3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	7,9 ± 0,8	97,1 ± 1,6
R4	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,1 ± 0,0	6,3 ± 0,3	109,2 ± 1,4
R5	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,0	4,0 ± 0,8	104,0 ± 2,0
R6	1,8 ± 0,5	2,4 ± 0,9	0,1 ± 0,0	8,2 ± 3,4	96,9 ± 8,1
R7	5,6 ± 0,7	11,8 ± 6,1	0,1 ± 0,0	2,4 ± 1,7	91,8 ± 1,7
R8	4,3 ± 0,5	6,2 ± 0,9	0,1 ± 0,0	5,6 ± 1,0	94,4 ± 0,9
R9	4,7 ± 0,3	13,5 ± 0,8	0,1 ± 0,0	1,9 ± 0,3	86,2 ± 6,4

f)

AG1-CH-OPEr					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	3,4 ± 0,1	7,3 ± 0,7	7,0 ± 0,5	8,6 ± 1,6	75,3 ± 9,4
R2	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	3,9 ± 0,1	99,4 ± 0,2
R3	3,3 ± 0,0	7,9 ± 0,5	8,3 ± 0,0	4,5 ± 0,3	83,7 ± 0,1
R4	4,4 ± 0,6	8,4 ± 0,1	8,4 ± 0,8	4,7 ± 0,2	80,8 ± 1,7
R5	4,4 ± 0,5	7,8 ± 0,9	7,9 ± 1,0	5,0 ± 0,3	83,7 ± 0,3
R6	9,5 ± 2,0	9,4 ± 0,4	9,9 ± 0,1	8,2 ± 4,8	72,6 ± 4,4
R7	12,1 ± 3,8	10,1 ± 0,6	9,6 ± 1,3	16,8 ± 1,7	56,1 ± 3,5
R8	9,1 ± 0,0	6,0 ± 2,8	7,0 ± 2,7	11,1 ± 3,5	71,2 ± 8,1
R9	19,5 ± 0,0	12,6 ± 0,5	11,9 ± 0,1	18,1 ± 0,2	42,8 ± 0,1

g)

AG1-GA-OPEr					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	2,7 ± 0,4	4,9 ± 1,4	4,2 ± 2,8	4,5 ± 0,0	84,7 ± 5,0
R2	4,6 ± 0,0	8,1 ± 0,6	8,3 ± 0,1	4,6 ± 0,5	82,2 ± 9,0
R3	5,9 ± 0,4	8,0 ± 1,4	9,0 ± 2,8	5,8 ± 0,0	77,1 ± 0,0
R4	16,6 ± 0,4	11,0 ± 1,4	10,0 ± 2,8	7,7 ± 0,0	61,0 ± 0,0
R5	31,5 ± 0,4	8,5 ± 1,4	2,6 ± 0,0	6,2 ± 0,0	55,3 ± 0,1

h)

AG4-CH-OPEr					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	66,1 ± 6,8	11,2 ± 3,5	1,4 ± 0,5	6,5 ± 2,2	16,5 ± 2,5

i)

AG4-GA-OPEr					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	71,9 ± 6,6	5,0 ± 2,2	1,4 ± 0,6	5,6 ± 1,5	17,9 ± 1,6

j)

Cal A®					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	66,1 ± 6,8	11,2 ± 3,5	1,4 ± 0,5	6,5 ± 2,2	16,5 ± 2,5

k)

AMNP-CH-Cal A					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	3,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0	13,4 ± 0,5	83,2 ± 0,4
R2	5,5 ± 0,6	4,2 ± 1,0	0,2 ± 0,0	21,9 ± 1,1	78,6 ± 0,1
R3	2,9 ± 0,3	1,6 ± 0,4	0,2 ± 0,0	8,3 ± 0,2	96,4 ± 2,6
R4	3,4 ± 0,2	0,7 ± 0,0	0,2 ± 0,0	6,7 ± 0,7	100,2 ± 1,3
R5	5,9 ± 0,3	3,9 ± 0,7	0,1 ± 0,0	6,5 ± 1,3	92,0 ± 5,0
R6	2,7 ± 0,8	1,8 ± 0,6	0,1 ± 0,0	4,2 ± 0,0	99,2 ± 4,1
R7	4,9 ± 0,7	2,5 ± 0,4	0,2 ± 0,0	8,4 ± 2,8	93,1 ± 13,3
R8	6,8 ± 0,0	3,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	2,0 ± 0,0	97,8 ± 2,8
R9	10,5 ± 1,8	5,2 ± 1,6	0,1 ± 0,0	5,8 ± 0,7	84,3 ± 8,3

l)

AMNP-GA-Cal A					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	83,6 ± 0,5	9,9 ± 0,4	0,2 ± 0,0	2,1 ± 0,0	10,8 ± 0,6

m)

<b>Eversa®</b>					
<b>Número de reciclado</b>	<b>% TGs</b>	<b>% DGs</b>	<b>% MGs</b>	<b>% AGs</b>	<b>% EMs</b>
R1	2,0 ± 0,9	1,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	4,7 ± 0,1	98,1 ± 2,4

n)

<b>AMNP-CH-Eversa</b>					
<b>Número de reciclado</b>	<b>% TGs</b>	<b>% DGs</b>	<b>% MGs</b>	<b>% AGs</b>	<b>% EMs</b>
R1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	4,3 ± 0,7	98,2 ± 1,4
R2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	15,2 ± 1,0	106,1 ± 1,1
R3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	8,9 ± 1,6	117,7 ± 11,2
R4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	7,2 ± 1,8	103,6 ± 3,1
R5	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0	14,7 ± 5,5	93,7 ± 0,4
R6	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	6,4 ± 1,2	102,4 ± 5,1
R7	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	11,1 ± 0,2	105,6 ± 6,9
R8	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	4,7 ± 0,0	109,6 ± 2,1
R9	0,2 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,0	5,6 ± 0,1	107,5 ± 1,8

ñ)

<b>AMNP-GA-Eversa</b>					
<b>Número de reciclado</b>	<b>% TGs</b>	<b>% DGs</b>	<b>% MGs</b>	<b>% AGs</b>	<b>% EMs</b>
R1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	4,5 ± 0,3	101,8 ± 0,4
R2	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	2,9 ± 0,3	105,2 ± 0,4
R3	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	2,7 ± 0,2	104,7 ± 1,4
R4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,9 ± 0,1	101,0 ± 1,7
R5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	102,1 ± 2,9
R6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,1	101,6 ± 0,5
R7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,9	100,9 ± 2,9
R8	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0	102,4 ± 6,0
R9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	2,6 ± 0,1	100,1 ± 8,1



o)

Cal B®					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	98,6 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	4,3 ± 1,9

p)

AMNP-CH-Cal B					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	100,3 ± 3,0	2,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2

q)

AMNP-GA-Cal B					
Número de reciclado	% TGs	% DGs	% MGs	% AGs	% EMs
R1	99,6 ± 0,2	3,5 ± 0,6	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	3,3 ± 0,0

## Anexo III

### Tabla resumen rendimientos síntesis ésteres metílicos primer y último ciclo

Se muestran los valores de % de ésteres metílicos (EMs) en el primer y último ciclo de reacción (indicado entre paréntesis) para cada catalizador probado con al menos un 10% de EMs sintetizados.

Catalizador	% EMs en el primer ciclo de reacción	% EMs en el último ciclo de reacción
<b>OPEr</b>	20,0 ± 0,2	-
SiMAG-Octyl-OPEr	83,6 ± 2,9	86,2 ± 6,4 (9)
AMNP-CH-OPEr	84,9 ± 4,2	93,5 ± 0,0 (9)
AG1-CH-OPEr	75,3 ± 9,4	42,8 ± 0,1 (9)
AG4-CH-OPEr	16,5 ± 2,5	-
AMNP-GA-OPEr	50,0 ± 0,8	20,8 ± 3,5 (4)
AG1-GA-OPEr	84,7 ± 5,0	55,3 ± 0,1 (5)
AG4-GA-OPEr	17,9 ± 1,6	-
mCLEAs-OPEr	92,2 ± 5,3	66,9 ± 0,2 (9)
<b>Cal A</b>	16,5 ± 2,5	-
AMNP-CH-Cal A	83,2 ± 0,4	84,3 ± 8,3 (9)
AMNP-GA-Cal A	10,8 ± 0,6	-
<b>Eversa</b>	98,1 ± 2,4	-
AMNP-CH-Eversa	98,2 ± 1,4	107,5 ± 1,8 (9)
AMNP-GA-Eversa	101,8 ± 0,4	100,1 ± 8,1 (9)

## Anexo IV

### Tabla transesterificación con oleato de metilo no comercial

Concentración (mg/mL) de sustratos iniciales y productos sintetizados al cabo de 2 horas en la transesterificación de  $\beta$ -sitoestanol con oleato de metilo sintetizado con AMNP-CH-OPeR.

AGs: ácidos grasos; DGs: diglicéridos; EMs: ésteres metílicos. R indica el número de ciclos de reacción.

	0 h mg/mL	2 h mg/mL
<b>R1</b>		
<b><math>\beta</math>-sitostanol</b>	32 $\pm$ 0	26 $\pm$ 0
<b>AGs</b>	15 $\pm$ 0	33 $\pm$ 1
<b>DGs</b>	6 $\pm$ 0	6 $\pm$ 0
<b>EMs</b>	601 $\pm$ 0	604 $\pm$ 12
<b>R2</b>		
<b><math>\beta</math>-sitostanol</b>	30 $\pm$ 0	6 $\pm$ 0
<b>AGs</b>	41 $\pm$ 2	149 $\pm$ 5
<b>DGs</b>	5 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0
<b>EMs</b>	594 $\pm$ 4	572 $\pm$ 1
<b>R3</b>		
<b><math>\beta</math>-sitostanol</b>	31 $\pm$ 1	5 $\pm$ 0
<b>AGs</b>	22 $\pm$ 2	148 $\pm$ 3
<b>DGs</b>	5 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0
<b>EMs</b>	591 $\pm$ 18	563 $\pm$ 28
<b>R4</b>		
<b><math>\beta</math>-sitostanol</b>	31 $\pm$ 0	6 $\pm$ 0
<b>AGs</b>	25 $\pm$ 1	143 $\pm$ 0
<b>DGs</b>	5 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0
<b>EMs</b>	584 $\pm$ 13	562 $\pm$ 17
<b>R5</b>		
<b><math>\beta</math>-sitostanol</b>	31 $\pm$ 1	6 $\pm$ 0
<b>AGs</b>	22 $\pm$ 2	134 $\pm$ 8
<b>DGs</b>	5 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0
<b>EMs</b>	584 $\pm$ 17	579 $\pm$ 0



## ***7. Bibliografía***



- Adewale, P., Vithanage, L.N., Christopher, L., 2017. Optimization of enzyme-catalyzed biodiesel production from crude tall oil using Taguchi method. *Energy Convers. Manag.* 154, 81–91. <https://doi.org/10.1016/J.ENCONMAN.2017.10.045>
- Adlercreutz, P., 2013. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6406–6436. <https://doi.org/10.1039/c3cs35446f>
- Akoh, C.C., Lee, G., Shaw, J., 2004. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids* 39, 513–526. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11745-004-1258-7>
- Al-Zuhair, S., 2007. Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 1, 57–66. <https://doi.org/10.1002/bbb.2>
- Albuquerque, T.L.D., Rueda, N., Dos Santos, J.C.S., Barbosa, O., Ortiz, C., Binay, B., Özdemir, E., Gonçalves, L.R.B., Fernandez-Lafuente, R., 2016. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. *Process Biochem.* 51, 865–874. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.002>
- Alcaraz, L., Isasi, J., Caballero, A.C., Izquierdo, J.G., Bañares, L., 2015. Nanopowders  $Y_{1-y}Nd_yV_{1-x}Cr_xO_4$  with  $y=0$  and  $1$ ;  $x=0$ ,  $0.1$ ,  $0.2$  and  $0.5$  synthesized by a sol–gel process. Relationship between morphological characteristics and optical properties. *J. Lumin.* 161, 110–116. <https://doi.org/10.1016/J.JLUMIN.2014.12.071>
- Ali, Y. Ben, Verger, R., Abousalham, A., 2012. Lipases or Esterases: does it really matter? Toward a new bio-physico-chemical classification, in: Sandoval, G. (Ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 31–51. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_2)
- Alonso-Cristobal, P., Oton-Fernandez, O., Mendez-Gonzalez, D., Díaz, J.F., Lopez-Cabarcos, E., Barasoain, I., Rubio-Retama, J., 2015. Synthesis, characterization, and application in HeLa cells of an NIR light responsive doxorubicin delivery system based on  $NaYF_4:Yb,Tm@SiO_2$ -PEG nanoparticles.

- ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 14992–14999. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03881>
- Alvarez-Macarie, E., Baratti, J., 2000. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. J. Mol. Catal. - B Enzym. 10, 377–383. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00109-5)
- Amiri, M., Pardakhti, A., Ahmadi-Zeidabadi, M., Akbari, A., Salavati-Niasari, M., 2018. Magnetic nickel ferrite nanoparticles: green synthesis by *Urtica* and therapeutic effect of frequency magnetic field on creating cytotoxic response in neural cell lines. Colloids Surf. B 172, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.049>
- Andersen, B.R., Abele, D.C., Vannier, W.E., 1966. Effects of mild periodate oxidation on antibodies. J. Immunol. 97, 913–924.
- Andrade, T.A., Errico, M., Christensen, K. V., 2017. Evaluation of reaction mechanisms and kinetic parameters for the transesterification of castor oil by liquid enzymes. Ind. Eng. Chem. Res. 56, 9478–9488. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b02285>
- Ansorge-Schumacher, M.B., Thum, O., 2013. Immobilised lipases in the cosmetics industry. Chem. Soc. Rev. 42, 6475–6490. <https://doi.org/10.1039/C3CS35484A>
- Anwar, M.Z., Kim, D.J., Kumar, A., Patel, S.K.S., Otari, S., Mardina, P., Jeong, J.H., Sohn, J.H., Kim, J.H., Park, J.T., Lee, J.K., 2017. SnO<sub>2</sub> hollow nanotubes: A novel and efficient support matrix for enzyme immobilization. Sci. Rep. 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15550-y>
- Arana-Peña, S., Lokha, Y., Fernández-Lafuente, R., 2019. Immobilization on octyl-agarose beads and some catalytic features of commercial preparations of lipase a from *Candida antarctica* (Novocor ADL): Comparison with immobilized lipase B from *Candida antarctica*. Biotechnol. Prog. 35. <https://doi.org/10.1002/btpr.2735>
- Arana-Peña, S., Lokha, Y., Fernández-Lafuente, R., 2018. Immobilization of Eversa lipase on octyl agarose beads and preliminary characterization of stability and activity features. Catalysts 8. <https://doi.org/10.3390/catal8110511>
- Arroyo, M., Acebal, C., de la Mata, I., 2014. Biocatálisis y



- biotecnología. ARBOR Ciencia, Pensam. y Cult. 190, 1–11.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3989/arbor.2014.i768>
- Arroyo, M., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., 1999. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. Enzyme Microb. Technol. 24, 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00067-2)
- Badoei-dalfard, A., Malekabadi, S., Karami, Z., Sargazi, G., 2019. Magnetic cross-linked enzyme aggregates of Km12 lipase: A stable nanobiocatalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil. Renew. Energy 141, 874–882. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.061>
- Barba Cedillo, V., Plou, F.J., Martínez, M.J., Barba, V., Plou, F.J., Martínez, M.J., 2012. Recombinant sterol esterase from *Ophiostoma piceae*: an improvement biocatalyst expressed in *Pichia pastoris*. Microb. Cell Fact. 11, 1–14.
- Barba, V., Prieto, A., Martínez, Á.T., Martínez, M.J., 2011. Procedimiento de acilación para la obtención de compuestos de interés alimenticio y/o farmacéutico utilizando esteroles esterasesas fúngicas. ES2 395 582 A1.
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Rodrigues, R.C.R.C., Fernandez-Lafuente, R., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R.C.R.C., Fernandez-Lafuente, R., 2014. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. RSC Adv. 4, 1583–1600. <https://doi.org/10.1039/c3ra45991h>
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., 2012. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. Process Biochem. 47, 1220–1227. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.04.019>
- Barriuso, J., Vaquero, M.E., Prieto, A., Martínez, M.J., 2016. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: a review. Biotechnol. Adv. 34, 874–885. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.05.004>
- Basher, S., Plat, D., 2004. Enzymatic modification of sterols

- using sterol-specific lipase. 2004/0105931 A1.
- Basso, A., Serban, S., 2019. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Mol. Catal.* 479, 110607. <https://doi.org/10.1016/J.MCAT.2019.110607>
- Bernal, C., Rodríguez, K., Martínez, R., 2018. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. *Biotechnol. Adv.* 36, 1470–1480. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.06.002>
- Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, G.D.-O.C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2006. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 877–882. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2006.01.014>
- Bilal, M., Zhao, Y., Rasheed, T., Iqbal, H.M.N., 2018. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 120, 2530–2544. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.09.025>
- Bini, R.A., Marques, R.F.C., Santos, F.J., Chaker, J.A., Jafelicci, M., 2012. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes. *J. Magn. Magn. Mater.* 324, 534–539. <https://doi.org/10.1016/J.JMMM.2011.08.035>
- Borges Reis, C.L., Almeida de Sousa, E.Y., de França Serpa, J., Casemiro Oliveira, R., Sousa dos Santos, J.C.S., 2019. Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. *Quim. Nov.* XY, 1–16. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>
- Bornscheuer, U.T., 2018. The fourth wave of biocatalysis is approaching. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 376, 1–7. <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0063>
- Bornscheuer, U.T., 2002. Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 73–81. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00075-4)

- Bornscheuer, U.T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C., Robins, K., 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485, 185–194. <https://doi.org/10.1038/nature11117>
- Borrelli, G.M., Trono, D., 2015. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>
- Bousquet-Dubouch, M.P., Graber, M., Sousa, N., Lamare, S., Legoy, M.D., 2001. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping-Pong Bi-Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1550, 90–99. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00273-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00273-4)
- Brady, D., Jordaan, J., 2009. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol. Lett.* 31, 1639–1650. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0076-4>
- Brault, G., Shareck, F., Hurtubise, Y., Lépine, F., Doucet, N., 2014. Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an *E. coli* whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase. *PLoS One* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091872>
- Braun, K., Stürzel, C.M., Biskupek, J., Kaiser, U., Kirchhoff, F., Lindén, M., 2018. Comparison of different cytotoxicity assays for in vitro evaluation of mesoporous silica nanoparticles. *Toxicol. Vit.* 52, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.06.019>
- Bretthauer, R.K., Castellino, F.J., 1999. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30, 193–200. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999.tb00770.x>
- Brocca, S., Secundo, F., Ossola, M., Alberghina, L., Carrea, G., Lotti, M., 2003. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Sci.* 12, 2312–2319. <https://doi.org/10.1110/ps.0304003>
- Brundiek, H.B., Evitt, A.S., Kourist, R., Bornscheuer, U.T., 2012.

- Creation of a lipase highly selective for trans fatty acids by protein engineering. *Angew. Chemie Int. Ed.* 51, 412–414. <https://doi.org/10.1002/anie.201106126>
- Buey, R.M., Barasoain, I., Jackson, E., Meyer, A., Giannakakou, P., Paterson, I., Mooberry, S., Andreu, J.M., Díaz, J.F., 2005. Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity. *Chem. Biol.* 12, 1269–1279. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2005.09.010>
- Calero-Rueda, O., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Muñoz, M.C., Plou, F.J., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2002a. Method for the enzymatic control of pitch deposits formed during paper pulp production using an esterase that hydrolyses triglycerides and sterol esters. WO 02/075045 A1R1.
- Calero-Rueda, O., Plou, F.J., Ballesteros, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2002b. Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1599, 28–35. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00378-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00378-3)
- Canet, A., Bonet-Ragel, K., Benaiges, M.D., Valero, F., 2016. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. *Biomass Bioenerg.* 85, 94–99. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2015.11.021>
- Cantone, S., Ferrario, V., Corici, L., Ebert, C., Fattor, D., Spizzo, P., Gardossi, L., 2013. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6262–6276. <https://doi.org/10.1039/c3cs35464d>
- Cao, H., He, J., Deng, L., Gao, X., 2009. Fabrication of cyclodextrin-functionalized superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/amino-silane core-shell nanoparticles via layer-by-layer method. *Appl. Surf. Sci.* 255, 7974–7980. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.04.199>
- Cao, L., 2005. Carrier-bound immobilized enzymes, Carrier-bound Immobilized Enzymes. <https://doi.org/10.1002/3527607668>

- Cao, L., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., 2000. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org. Lett.* 2, 1361–1364. <https://doi.org/10.1021/ol005593x>
- Cao, M., Li, Z., Wang, J., Ge, W., Yue, T., li, R., Colvin, V., Yu, W., 2012. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends Food Sci. Technol.* 27, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.04.003>
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., 2012. Lipases and Phospholipases. *Methods Mol. Biol.* 861, 3–30. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5>
- Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., Sandoval, G., 2018. Lipases: an overview, in: Sandoval, G. (Ed.), *Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology*, Vol 1835. Humana Press, New York, NY, pp. 3–38.
- Cedillo, V.B., Prieto, A., María, M.J., 2013. Potential of *Ophiostoma piceae* sterol esterase for biotechnologically relevant hydrolysis reactions. *Bioengineered* 4, 249–253. <https://doi.org/10.4161/bioe.22818>
- Chapman, J., Ismail, A.E., Dinu, C.Z., 2018. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts* 8, 20–29. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Chen, Y.Y., Tsai, M.G., Chi, M.C., Wang, T.F., Lin, L.L., 2013. Covalent immobilization of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyl transpeptidase on aldehyde-functionalized magnetic nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 4613–4628. <https://doi.org/10.3390/ijms14034613>
- Chen, Z.Y., Jiao, R., Ka, Y.M., 2008. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8761–8773. <https://doi.org/10.1021/jf801566r>
- Choong, T.S.Y., Yeoh, C.M., Phuah, E.T., Siew, W.L., Lee, Y.Y., Tang, T.K., Abdullah, L.C., 2018. Kinetic study of lipase-catalyzed glycerolysis of palm olein using Lipozyme TLIM in solvent-free system. *PLoS One* 13, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192375>

- Christopher, L.P., Hemanathan Kumar, Zambare, V.P., 2014. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Appl. Energy* 119, 497–520. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2014.01.017>
- Chuensangjun, C., Pechyen, C., Chisti, Y., Sirisansaneeyakul, S., 2012. Lipase-catalysed polymerization of lactic acid and the properties of the polymer. *Adv. Mater. Res.* 506, 154–157. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.506.154>
- Cipolatti, E.P., Valério, A., Henriques, R.O., Moritz, D.E., Ninow, J.L., Freire, D.M.G., Manoel, E.A., Fernandez-Lafuente, R., De Oliveira, D., 2016. Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends. *RSC Adv.* <https://doi.org/10.1039/c6ra22047a>
- Corradini, F.A.S., Alves, E.S., Kopp, W., Ribeiro, M.P.A., Mendes, A.A., Tardioli, P.W., Giordano, R.C., Giordano, R.L.C., 2019. Kinetic study of soybean oil hydrolysis catalyzed by lipase from solid castor bean seeds. *Chem. Eng. Res. Des.* 144, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.02.008>
- Cruz-Izquierdo, Á., Picó, E.A., López, C., Serra, J.L., Llama, M.J., 2014. Magnetic cross-linked enzyme aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* lipase: An efficient and stable biocatalyst for biodiesel synthesis. *PLoS One* 9, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115202>
- Cui, J., Cui, L., Jia, S., Su, Z., Zhang, S., 2016. Hybrid cross-linked lipase aggregates with magnetic nanoparticles: A robust and recyclable biocatalysis for the epoxidation of oleic acid. *J. Agric. Food Chem.* 64, 7179–7187. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01939>
- Cui, Y., Li, Y., Yang, Y., Liu, X., Lei, L., Zhou, L., Pan, F., 2010. Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and application for lipase immobilization. *J. Biotechnol.* 150, 171–174.
- Cusack, L.K., Fernandez, M.L., Volek, J.S., 2013. The food matrix and sterol characteristics affect the plasma cholesterol lowering of phytosterol/phytostanol. *Adv. Nutr.* 4, 633–643. <https://doi.org/10.3945/an.113.004507>
- De Godoy Daiha, K., Angeli, R., De Oliveira, S.D., Almeida, R.V., 2015. Are lipases still important biocatalysts? A study of



- scientific publications and patents for technological forecasting. PLoS One 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131624>
- De Melo, R.R., Alnoch, R.C., Vilela, A.F.L., De Souza, E.M., Krieger, N., Ruller, R., Sato, H.H., Mateo, C., 2017. New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: A tool for enzyme immobilization at neutral pH. *Molecules* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22071088>
- Del Campo, A., Sen, T., Lellouche, J.-P., Bruce, I.J., 2005. Multifunctional magnetite and silica–magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. *J. Magn. Magn. Mater.* 293, 33–40. <https://doi.org/10.1016/J.JMMM.2005.01.040>
- Dent, A.H., 2020. Conjugation methods categories of conjugates employed in immunoassay. *Immunoass. Handb.* 301–313. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00014-2>
- Dimitrijević, A., Veličković, D., Bihelović, F., Bezbradica, D., Jankov, R., Milosavić, N., 2012. One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite. *Bioresour. Technol.* 107, 358–362. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.11.077>
- Doering, T.L., Cummings, R.D., Aebi, M., 2015. Fungi, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology* [Internet]. Cold Spring Harbor (NY), pp. 293–304. <https://doi.org/10.1101/glycobiology.3e.023>
- Domínguez de María, P., Alcantara, A., Carballeira, J., de la Casa, R., Garcia-Burgos, C., Hernaiz, M., Sanchez-Montero, J., Sinisterra, J., 2006a. *Candida rugosa* lipase: A traditional and complex biocatalyst. *Curr. Org. Chem.* 10, 1053–1066. <https://doi.org/10.2174/138527206777698057>
- Domínguez de María, P., Carboni-Oerlemans, C., Tuin, B., Bargeman, G., Van Der Meer, A., Van Gemert, R., 2005. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 37, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.09.001>
- Domínguez de María, P., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.

- V., Alcántara, A.R., 2006b. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* 24, 180–196. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.003>
- Dubascoux, S., Wyser, Y., 2019. Nanomaterials in food: An overview. *Encycl. Food Chem.* 110–117. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22459-1>
- Duquesne, S., Bordes, F., Fudalej, F., Nicaud, J.-M., Marty, A., 2012. The yeast *Yarrowia lipolytica* as a generic tool for molecular evolution of enzymes, in: Sandoval, G. (Ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 301–312. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_18)
- Ericsson, D.J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Sandström, A.G., Bäckvall, J.-E., Mowbray, S.L., 2008. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *J. Mol. Biol.* 376, 109–119. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2007.10.079>
- Facin, B.R., Melchior, M.S., Valério, A., Oliveira, J.V., Oliveira, D. De, 2019. Driving immobilized lipases as biocatalysts: 10 years state of the art and future prospects. *Ind. Eng. Chem. Res.* 58, 5358–5378. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00448>
- Facin, B.R., Valério, A., Bresolin, D., Centenaro, G., de Oliveira, D., Oliveira, J.V., 2018. Improving reuse cycles of *Thermomyces lanuginosus* lipase (NS-40116) by immobilization in flexible polyurethane. *Biocatal. Biotransformation* 36, 372–380. <https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1458842>
- Fernandez-Lafuente, R., 2010. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 62, 197–212. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010>
- Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., M. Guisán, J., 1998. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem. Phys. Lipids* 93, 185–197. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00042-5)



- Fernandez-Lopez, L., Pedrero, S.G., Lopez-Carrobles, N., Gorines, B.C., Virgen-Ortíz, J.J., Fernandez-Lafuente, R., 2017. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 98, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.002>
- Fernandez-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, C., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisan, J.M., 2008. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem.* 43, 1061–1067. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2008.05.009>
- Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Mateo, C., Munilla, R., Ortiz, C., Cabrera, Z., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., 2006. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. *Biomacromolecules* 7, 2610–2615. <https://doi.org/10.1021/bm060408+>
- Ferrario, V., Veny, H., De Angelis, E., Navarini, L., Ebert, C., Gardossi, L., 2013. Lipases immobilization for effective synthesis of biodiesel starting from coffee waste oils. *Biomolecules* 3, 514–534. <https://doi.org/10.3390/biom3030514>
- Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F., Valero, F., 2013. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron. J. Biotechnol.* 16. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-5>
- Ferreira, M.M., Santiago, F.L.B., Silva, N.A.G. d., Luiz, J.H.H., Fernández-Lafuente, R., Mendes, A.A., Hirata, D.B., 2018. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. *Process Biochem.* 67, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.028>
- Filho, D.G., Silva, A.G., Guidini, C.Z., 2019. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7399–7423. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B., 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel

- structural approach. *Biochimie* 82, 1033–1041.
- Fraga, F.C., Valério, A., de Oliveira, V.A., Di Luccio, M., de Oliveira, D., 2019. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: enzymatic activity and structural conformation. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 653–658. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.171>
- Friedrich, J.L.R., Peña, F.P., Garcia-Galan, C., Fernandez-Lafuente, R., Ayub, M.A.Z., Rodrigues, R.C., 2013. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 1089–1095. <https://doi.org/10.1002/jctb.3945>
- Galeano Diaz, T., Durán Merás, I., Sánchez Casas, J., Alexandre Franco, M.F., 2005. Characterization of virgin olive oils according to its triglycerides and sterols composition by chemometric methods. *Food Control* 16, 339–347. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2004.03.014>
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, A., Fernández-Lafuente, R., Rodrigues, R.C., 2011. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv. Synth. Catal.* 353, 2885–2904. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>
- Gill, S.C., von Hippel, P.H., 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319–326. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7)
- Gonçalves, K.M., Barbosa, L.R.S., Lima, L.M.T.R., Cortines, J.R., Kalume, D.E., Leal, I.C.R., Mariz e Miranda, L.S., de Souza, R.O.M., Cordeiro, Y., 2014. Conformational dissection of *Thermomyces lanuginosus* lipase in solution. *Biophys. Chem.* 185, 88–97. <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2013.12.001>
- Gricajeva, A., Kazlauskas, S., Kalėdienė, L., Bendikienė, V., 2018. Analysis of *Aspergillus* sp. lipase immobilization for the application in organic synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 1165–1175. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.010>
- Griffiths, P.R., 1992. The Handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules, Vibrational

- Spectroscopy. [https://doi.org/10.1016/0924-2031\(92\)87021-7](https://doi.org/10.1016/0924-2031(92)87021-7)
- Gruber, C.C., Pleiss, J., 2012. Molecular modeling of lipase binding to a substrate-water interface, in: Sandoval, G. (Ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 313–327. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_19)
- Guillén, M., Benaiges, M.D., Valero, F., 2016. Improved ethyl butyrate synthesis catalyzed by an immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase: A comprehensive statistical study by production, reaction rate and yield analysis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133, S371–S376. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2017.02.010>
- Guillén, M., Benaiges, M.D., Valero, F., 2012. Biosynthesis of ethyl butyrate by immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*. *Biochem. Eng. J.* 65, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2012.03.009>
- Guisan, J. (Ed.), 2006. *Immobilization of enzymes and cells*, 2nd ed. Humana Press, Totowa, New Jersey. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7>
- Gupta, R., Kumari, A., Syal, P., Singh, Y., 2015. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog. Lipid Res.* 57, 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.12.001>
- Gutiérrez-Fernández, J., Vaquero, M.E., Prieto, A., Barriuso, J., Martínez, M.J., Hermoso, J.A., 2014. Crystal structures of *Ophiostoma piceae* sterol esterase: structural insights into activation mechanism and product release. *J. Struct. Biol.* 187, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.07.007>
- Gutiérrez-Lazaro, A., Velasco, D., Boldrini, E.D., Yustos, P., Esteban, J., Ladero, M., 2018. Effect of operating variables and kinetics of the lipase catalyzed transesterification of ethylene carbonate and glycerol. *Fermentation*. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030075>
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Jesús Martínez, M., Martínez, A.T., 2001. The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends Biotechnol.* 19, 340–348. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01705-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01705-X)

- Hakalin, N.L.S., Molina-Gutiérrez, M., Prieto, A., Martínez, M.J., 2018. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of  $\beta$ -sitostanol esters by response surface methodology. *Food Chem.* 261, 139–148. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.04.031>
- Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* 38, 453–468. <https://doi.org/10.1039/B711564B>
- Hari Krishna, S., Persson, M., Bornscheuer, U.T., 2002. Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry* 13, 2693–2696. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00739-5](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00739-5)
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 235–251. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2005.10.016>
- He, W.-S., Cui, D.-D., Zhang, Y.-L., Liu, Y., Yin, J., Chen, G., Jia, C.-S., Feng, B., 2017. Highly efficient synthesis of phytosterol linolenate catalyzed by *Candida rugosa* lipase through transesterification. *Food Sci. Technol. Res.* 23, 525–533. <https://doi.org/10.3136/fstr.23.525>
- He, W., Jia, C., Ma, Y., Yang, Y., Zhang, X., Feng, B., Yue, L., 2010. Lipase-catalyzed synthesis of phytostanyl esters in non-aqueous media. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 67, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.07.006>
- Holmquist, M., 2000. Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1, 209–235.
- Ivić, J.T., Veličković, D., Dimitrijević, A., Bezbradica, D., Dragačević, V., Jankulović, M.G., Milosavić, N., 2016. Design of biocompatible immobilized *Candida rugosa* lipase with potential application in food industry. *J. Sci. Food Agric.* 96, 4281–4287. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7641>
- Jaeger, K.-E., Eggert, T., 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 390–397. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00341-5)
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16, 396–403.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01195-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01195-0)

- Jamil, F., Al-Haj, L., Al-Muhtaseb, A.H., Al-Hinai, M.A., Baawain, M., Rashid, U., Ahmad, M.N.M., 2018. Current scenario of catalysts for biodiesel production: A critical review. *Rev. Chem. Eng.* 34, 267–297. <https://doi.org/10.1515/revce-2016-0026>
- Jesionowski, T., Zdarta, J., Krajewska, B., 2014. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>
- Kang, C.-H., Oh, K.-H., Lee, M.-H., Oh, T.-K., Kim, B.H., Yoon, J.-H., 2011. A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. *Microb. Cell Fact.* 10, 41–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-41>
- Khan, F.I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., Wang, Y., 2017. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>
- Khan, N.R., Rathod, V.K., 2015. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochem.* 50, 1793–1806. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2015.07.014>
- Kim, B.H., Akoh, C.C., 2007. Modeling and optimization of lipase-catalyzed synthesis of phytosteryl esters of oleic acid by response surface methodology. *Food Chem.* 102, 336–342. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.05.025>
- Kim, M., Park, J.M., Um, H.J., Lee, D.H., Lee, K.H., Kobayashi, F., Iwasaka, Y., Hong, C.S., Min, J., Kim, Y.H., 2010. Immobilization of cross-linked lipase aggregates onto magnetic beads for enzymatic degradation of polycaprolactone. *J. Basic Microbiol.* 50, 218–226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13904>
- Kirk, O., Christensen, M.W., 2002. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Org. Process Res. Dev.* 6, 446–451. <https://doi.org/10.1021/op0200165>

- Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z., Prodanovic, R., 2006. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. *Biochem. Eng. J.* 30, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.05.009>
- Kong, B., Seog, J.H., Graham, L.M., Lee, S.B., 2011. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine* 6, 929–941. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.77>
- Kontkanen, H., Mustranta, A., Spetz, P., Buchert, J., Holmbom, B., Tenkanen, M., 2001. Production of esterases hydrolysing steryl esters. Abs.8th Intern.Conf.Biotechnology Pulp Pap. Ind. Helsinki, 4-8 June 190.
- Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S.S., Arora, P.K., 2016. Lipase catalysis in organic solvents: Advantages and applications. *Biol. Proced. Online*. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0033-2>
- Kumar, A., Gudiukaite, R., Gricajeva, A., Sadauskas, M., Malunavicius, V., Kamyab, H., Sharma, S., Sharma, T., Pant, D., 2020. Microbial lipolytic enzymes – promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation. *Energy* 192, 116674. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116674>
- Kumari, V., Shah, S., Gupta, M.N., 2007. Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. *Energy & Fuels* 21, 368–372. <https://doi.org/10.1021/ef0602168>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lai, J.-Q., Hu, Z.-L., Sheldon, R.A., Yang, Z., 2012. Catalytic performance of cross-linked enzyme aggregates of *Penicillium expansum* lipase and their use as catalyst for biodiesel production. *Process Biochem.* 47, 2058–2063. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.07.024>
- Lai, O.-M., Lee, Y.-Y., Phuah, E.-T., Akoh, C.C., 2019. Lipase/Esterase: properties and industrial applications. *Encycl. Food Chem.* 158–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21640-5>



- Laurent, S., Burtea, C., Thirifays, C., Häfeli, U.O., Mahmoudi, M., 2012. Crucial ignored parameters on nanotoxicology: The importance of toxicity assay modifications and “cell vision.” PLoS One 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029997>
- Li, C., Tan, T., Zhang, H., Feng, W., 2010. Analysis of the conformational stability and activity of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents: Insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations. J. Biol. Chem. 285, 28434–28441. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.136200>
- Li, X.-S., Zhu, G.-T., Luo, Y.-B., Yuan, B.-F., Feng, Y.-Q., 2013. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation. TrAC Trends Anal. Chem. 45, 233–247. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2012.10.015>
- Liu, G., Zhang, L., Wei, X., Zou, G., Qin, Y., Ma, L., Li, J., Zheng, H., Wang, S., Wang, C., Xun, L., Zhao, G.P., Zhou, Z., Qu, Y., 2013. Genomic and secretomic analyses reveal unique features of the lignocellulolytic enzyme system of *Penicillium decumbens*. PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055185>
- Liu, X., Kokare, C., 2017. Microbial enzymes of use in industry, Biotechnology of microbial enzymes: Production, biocatalysis and industrial applications. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Liu, Y., Guo, C., Liu, C.-Z., 2015. Novel magnetic cross-linked lipase aggregates for improving the resolution of (R, S)-2-octanol. Chirality 27, 199–204. <https://doi.org/10.1002/chir.22411>
- Longo, M.A., Sanromán, M.A., 2006. Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. Food Technol. Biotechnol. 44, 335–353.
- López, C., Cruz-Izquierdo, Á., Picó, E.A., Garcí-a-Bárcena, T., Villarroel, N., Llama, M.J., Serra, J.L., 2014. Magnetic biocatalysts and their uses to obtain biodiesel and biosurfactants. Front. Chem. 2, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00072>
- López Luengo, M.T., 2005. Fitoesteroles y fitoestanoles. Offarm 24, 90–94.
- Lotti, M., Alberghina, L., 2007. Lipases: Molecular structure and

- function, in: Polaina, J., MacCabe, A.P. (Eds.), *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Valencia, Spain, pp. 263–281.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0\\_16](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_16)
- Lotti, M., Pleiss, J., Valero, F., Ferrer, P., 2018. Enzymatic production of biodiesel: strategies to overcome methanol inactivation. *Biotechnol. J.* 1700155, 1–10.  
<https://doi.org/10.1002/biot.201700155>
- Luna, C., Luna, D., Bautista, F.M., Estevez, R., Calero, J., Posadillo, A., Romero, A.A., Sancho, E.D., 2017. Application of enzymatic extracts from a CALB standard strain as biocatalyst within the context of conventional biodiesel production optimization. *Molecules* 22, 2025.  
<https://doi.org/10.3390/molecules22112025>
- Maeda, A., Mizuno, T., Bunya, M., Sugihara, S., Nakayama, D., Tsunasawa, S., Hirota, Y., Sugihara, A., 2008. Characterization of novel cholesterol esterase from *Trichoderma* sp. AS59 with high ability to synthesize steryl esters. *J. Biosci. Bioeng.* 105, 341–349.  
<https://doi.org/10.1263/JBB.105.341>
- Mancheño, J.M., Pernas, M.A., Martínez, M.J., Ochoa, B., Rúa, M.L., Hermoso, J.A., 2003. Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: Crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 332, 1059–1069.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.005>
- Martínez, A.M., Avila, B.V.C., 2012. *Rational design of immobilized lipases and phospholipases*. Springer, New York.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5>
- Martins, A.B., da Silva, A.M., Schein, M.F., Garcia-Galan, C., Záchia Ayub, M.A., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C., 2014. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 105, 18–25.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2014.03.021>
- Martins, A.B., Schein, M.F., Friedrich, J.L.R., Fernandez-Lafuente, R., Ayub, M.A.Z., Rodrigues, R.C., 2013. Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by



- Novozym 435: Enhanced activity and operational stability. *Ultrason. Sonochem.* 20, 1155–1160. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.018>
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1451–1463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- McAuliffe, J.C., 2012. Industrial enzymes and biocatalysis, in: Kent, J.A. (Ed.), *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. Springer US, Boston, MA, pp. 1183–1227. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4259-2\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4259-2_31)
- Mehrasbi, M.R., Mohammadi, J., Peyda, M., Mohammadi, M., 2017. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. *Renew. Energy* 101, 593–602. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2016.09.022>
- Mendelson, M.I., 1969. Average grain size in polycrystalline ceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* 52, 443–446. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1969.tb11975.x>
- Miao, C., Yang, L., Wang, Z., Luo, W., Li, H., Lv, P., Yuan, Z., 2018. Lipase immobilization on amino-silane modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. *Fuel* 224, 774–782. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2018.02.149>
- Miao, M., Liu, H., Jiang, B., Yang, C., Xia, X., Zhang, T., 2014. Enzyme-catalysed synthesis of plant steryl laurate in non-aqueous media using salt hydrate pairs and its characterisation. *J. Funct. Foods* 7, 452–461. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.01.011>
- Milosavić, N.B., Prodanović, R.M., Veličković, D., Dimitrijević, A., 2017. Macroporous poly(GMA-co-EGDMA) for enzyme stabilization. *Methods Mol. Biol.* 1504, 139–147. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_11)
- Mittelbach, M., 1990. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 168–170. <https://doi.org/10.1007/BF02539619>

- Moazeni, F., Chen, Y.-C., Zhang, G., 2019. Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. *J. Clean. Prod.* 216, 117–128. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.01.181>
- Modenez, I.A., Sastre, D.E., Moares, F.C., Marques Netto, C.G.C., 2018. Influence of glutaraldehyde cross-linking modes on the recyclability of immobilized lipase B from *Candida antarctica* for transesterification of soy bean oil. *Molecules* 23, 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules23092230>
- Molina-Espeja, P., Santos-Moriano, P., García-Ruiz, E., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M., 2019. Structure-guided immobilization of an evolved unspecific peroxygenase. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms20071627>
- Monteiro, R.R.C., Lima, P.J.M., Pinheiro, B.B., Freire, T.M., Dutra, L.M.U., Fachine, P.B.A., Gonçalves, L.R.B., de Souza, M.C.M., Dos Santos, J.C.S., Fernandez-Lafuente, R., 2019. Immobilization of lipase a from *Candida antarctica* onto chitosan-coated magnetic nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20164018>
- Monti, J.L.E., Montes, M.R., Rossi, R.C., 2018. Steady-state analysis of enzymes with non-Michaelis-Menten kinetics: The transport mechanism of Na-/K--ATPase. *J. Biol. Chem.* 293, 1373–1385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.799536>
- Mosayebi, M., Salehi, Z., Doosthosseini, H., Tishbi, P., Kawase, Y., 2020. Amine, thiol, and octyl functionalization of GO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites to enhance immobilization of lipase for transesterification. *Renew. Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.03.040>
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mukherjee, M., 2003. Human digestive and metabolic lipases - A brief review. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 22, 369–376. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00052-3)
- Muley, A.B., Mulchandani, K.H., Singhal, R.S., 2020. Immobilization of enzymes on iron oxide magnetic

- nanoparticles: Synthesis, characterization, kinetics and thermodynamics, 1st ed, Methods in Enzymology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.10.016>
- Musa-Veloso, K., Poon, T.H., Elliot, J.A., Chung, C., 2011. A comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 85, 9–28. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2011.02.001>
- Nakamura, S., Hayashi, S., Koga, K., 1976. Effect of periodate oxidation on the structure and properties of glucose oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 445, 294–308. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(77\)80251-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-9084(77)80251-4)
- Negishi, S., Hidaka, I., Takahashi, I., Kunita, S., 2003. Transesterification of phytosterol and edible oil by lipase powder at high temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 905–907. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0794-x>
- Netto, C.G.C.M., Toma, H.E., Andrade, L.H., 2013. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 85–86, 71–92. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2012.08.010>
- Nikolaivits, E., Makris, G., Topakas, E., 2017. Immobilization of a cutinase from *Fusarium oxysporum* and application in pineapple flavor synthesis. *J. Agric. Food Chem.* 65, 3505–3511. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00659>
- Norinobu, S., Seo, N., Sato, F., Kaneko, S., Mankura, M., 2003. Process for producing dietary sterol fatty acid esters. US6.660.491 B2.
- Norjannah, B., Ong, H.C., Masjuki, H.H., Juan, J.C., Chong, W.T., 2016. Enzymatic transesterification for biodiesel production: A comprehensive review. *RSC Adv.* 6, 60034–60055. <https://doi.org/10.1039/c6ra08062f>
- Novozymes, 2014. New Enzyme Technology Converts Waste Oils into Biodiesel. [WWW Document].
- Ondul, E., Dizge, N., Albayrak, N., 2012. Immobilization of *Candida antarctica* A and *Thermomyces lanuginosus* lipases

- on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine. *Colloids Surf. B* 95, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.020>
- Ortiz, C., Ferreira, M.L., Barbosa, O., Dos Santos, J.C.S., Rodrigues, R.C., Berenguer-Murcia, Á., Briand, L.E., Fernandez-Lafuente, R., 2019. Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catal. Sci. Technol.* 9, 2380–2420. <https://doi.org/10.1039/c9cy00415g>
- Ostlund, R., 2007. Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids* 42, 41–45.
- Otero, C., Fernandez-Perez, M., Hermoso, J.A., Ripoll, M.M., 2005. Activation in the family of *Candida rugosa* isolipases by polyethylene glycol. *J. Mol. Catal. B-Enzymatic* 32, 225–229. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.12.008>
- Paitaid, P., H-Kittikun, A., 2019. Magnetic cross-linked enzyme aggregates of *Aspergillus oryzae* ST11 lipase using polyacrylonitrile coated magnetic nanoparticles for biodiesel production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03196-7>
- Palomo, J.M., Guisan, J.M., 2012. Different strategies for hyperactivation of lipase biocatalysts. *Methods Mol. Biol.* 861, 329–341. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_20)
- Pan, X., Chen, B., Wang, J., Zhang, X., Zhul, B., Tan, T., 2012. Enzymatic synthesizing of phytosterol oleic esters. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 68–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12010-011-9324-x>
- Panpipat, W., Xu, X., Guo, Z., 2013. Improved acylation of phytosterols catalyzed by *Candida antarctica* lipase A with superior catalytic activity. *Biochem. Eng. J.* 70, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.09.017>
- Park, H.J., Joo, J.C., Park, K., Yoo, Y.J., 2012. Stabilization of *Candida antarctica* lipase B in hydrophilic organic solvent by rational design of hydrogen bond. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17, 722–728. <https://doi.org/10.1007/s12257-012->

0092-4

- Parker, F.S., 1971. Applications of infrared spectroscopy in biochemistry, biology, and medicine. Plenum Press, New York. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/407481>
- Patel, A.K., Singhania, R.R., Pandey, A., 2017. Production, purification, and application of microbial enzymes. *Biotechnol. Microb. Enzym.* 13–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9>
- Patel, V., Gajera, H., Gupta, A., Manocha, L., Madamwar, D., 2015. Synthesis of ethyl caprylate in organic media using *Candida rugosa* lipase immobilized on exfoliated graphene oxide: Process parameters and reusability studies. *Biochem. Eng. J.* 95, 62–70. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2014.12.007>
- Patil, R.M., Shete, P.B., Thorat, N.D., Otari, S. V., Barick, K.C., Prasad, A., Ningthoujam, R.S., Tiwale, B.M., Pawar, S.H., 2014. Superparamagnetic iron oxide/chitosan core/shells for hyperthermia application: Improved colloidal stability and biocompatibility. *J. Magn. Mater.* 355, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2013.11.033>
- Paul, P.E.V., Sangeetha, V., Deepika, R.G., 2019. Emerging trends in the industrial production of chemical products by microorganisms. *Recent Dev. Appl. Microbiol. Biochem.* 107–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00009-X>
- Petrovský, E., Herrero-Bervera, E., Harinarayana, T., Ivers, D., 2011. The Earth's magnetic interior. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0323-0>
- Pires-Cabral, P., da Fonseca, M.M.R., Ferreira-Dias, S., 2009. Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. *Biochem. Eng. J.* 43, 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.002>
- Pleiss, J., Scheib, H., Schmid, R.D., 2000. The His gap motif in microbial lipases: A determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs. *Biochimie* 82, 1043–1052. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01181-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01181-0)
- Price, J., Nordblad, M., Martel, H.H., Chrabas, B., Wang, H.,

- Nielsen, P.M., Woodley, J.M., 2016. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m<sup>3</sup> using a liquid lipase formulation. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 1719–1728. <https://doi.org/10.1002/bit.25936>
- Prieto, A., Molina-Gutiérrez, M., López, F.A., García, I., Alcaraz, L., Martínez, M.J., 2019. Catalizador biológico reciclable obtenido a partir de masa negra de pilas desechadas para la síntesis de ésteres alquílicos de ácidos grasos volátiles P201930303.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R., 2009. Lipases at interfaces: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 147–148, 237–250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.06.001>
- Remonato, D., de Oliveira, J.V., Manuel Guisan, J., de Oliveira, D., Ninow, J., Fernandez-Lorente, G., 2018. Production of FAME and FAEE via alcoholysis of sunflower oil by Eversa lipases immobilized on hydrophobic supports. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 185, 705–716. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2683-1>
- Rodrigues, R.C., Virgen-Ortíz, J.J., dos Santos, J.C.S., Berenguer-Murcia, Á., Alcantara, A.R., Barbosa, O., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., 2019. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnol. Adv.* 37, 746–770. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.04.003>
- Romero, C.M.M., Spuches, F.C.C., Morales, A.H.H., Perotti, N.I.I., Navarro, M.C.C., Gómez, M.I.I., 2018. Design and characterization of immobilized biocatalyst with lipase activity onto magnetic magnesium spinel nanoparticles: A novel platform for biocatalysis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 172, 699–707. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.071>
- Romero, M.D., Calvo, L., Alba, C., Daneshfar, A., Ghaziaskar, H.S., 2005. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 42–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.05.004>



- Royter, M., Schmidt, M., Elend, C., Höbenreich, H., Schäfer, T., Bornscheuer, U.T., Antranikian, G., 2009. Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*. *Extremophiles* 13, 769–783. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0265-z>
- SÁ, A.G.A., Meneses, A.C. de, Araújo, P.H.H. de, Oliveira, D. de, 2017. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends Food Sci. Technol.* 69, 95–105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.004>
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V., 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *J. Biotechnol.* 119, 291–299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.009>
- Sanchez, S., Demain, A.L., 2017. Useful microbial enzymes-An introduction, *Biotechnology of microbial enzymes: Production, biocatalysis and industrial applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00001-7>
- Santos, J.C.S.D., Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., 2015. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. *ChemCatChem* 7, 2413–2432. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500310>
- Sarno, M., Iuliano, M., Polichetti, M., Ciambelli, P., 2017. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for banana flavour synthesis. *Process Biochem.* 56, 98–108. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2017.02.004>
- Schmidt-Dannert, C., 1999. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 2123–2130. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(99)00141-8)
- Schmitt, J., Brocca, S., Schmid, R.D., Pleiss, J., 2002. Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificit. *Protein Eng.* 15, 595–601. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(83\)90141-5](https://doi.org/10.1016/0165-1781(83)90141-5)

- Schoevaart, R., Wolbers, M.W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A.P.G., Van Rantwijk, F., Van Der Wielen, L.A.M., Sheldon, R.A., 2004. Preparation, optimization, and structures, of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol. Bioeng.* 87, 754–762. <https://doi.org/10.1002/bit.20184>
- Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Brocca, S., Lotti, M., 2004. Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugosa* lipase isoform 1 in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 236–240. <https://doi.org/10.1002/bit.20034>
- Sen, S., Puskas, J.E., 2015. Green polymer chemistry: Enzyme catalysis for polymer functionalization. *Molecules* 20, 9358–9379. <https://doi.org/10.3390/molecules20059358>
- Seo, N., Kaneko, S., Sato, F., Norinobu, S., Mankura, M., 2006. Process for producing edible sterol fatty acid esters. US6989456 B2.
- Shang, C.-Y., Li, W.-X., Zhang, R.-F., 2015. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on ZnO nanowires/macroporous silica composites for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. *Mater. Res. Bull.* 68, 336–342. <https://doi.org/10.1016/J.MATERRESBULL.2015.04.011>
- Sheldon, R.A., 2019. Cleas, combi-cleas and ‘smart’ magnetic cleas: Biocatalysis in a bio-based economy. *Catalysts* 9, 261. <https://doi.org/10.3390/catal9030261>
- Sheldon, R.A., van Pelt, S., 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
- Sheldon, R.A., Woodley, J.M., 2018. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem. Rev.* 118, 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>
- Shi, S., Yang, J., Liang, S., Li, M., Gan, Q., Xiao, K., Hu, J., 2018. Enhanced Cr(VI) removal from acidic solutions using biochar modified by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> particles. *Sci. Total Environ.* 628–629, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.091>
- Shuai, W., Das, R.K., Naghdi, M., Brar, S.K., Verma, M., 2017. A review on the important aspects of lipase immobilization on



- nanomaterials. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 64, 496–508.  
<https://doi.org/10.1002/bab.1515>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P.K., 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 6.  
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Sirisha, V.L., Jain, Ankita, Jain, Amita, 2016. Enzyme immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Adv. Food Nutr. Res.* 79, 179–211.  
<https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2016.07.004>
- Skjøl, M., de Maria, L., Chatterjee, R., Svendsen, A., Patkar, S.A., Østergaard, P.R., Brask, J., 2009. Understanding the plasticity of the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold: Lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties. *ChemBioChem* 10, 520–527. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800668>
- Soee, J.B., Joergensen, T.L., 2010. Method for producing phytosterol/phytostanol phospholipid esters. *PCT Int. Appl.* WO2010109441A1.
- Stergiou, P.Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., Papamichael, E.M., 2013. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol. Adv.* 31, 1846–1859.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.08.006>
- Suresh, M., Jawahar, C.P., Richard, A., 2018. A review on biodiesel production, combustion, performance, and emission characteristics of non-edible oils in variable compression ratio diesel engine using biodiesel and its blends. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 92, 38–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.048>
- Tacias-Pascacio, V.G., Peirce, S., Torrestiana-Sanchez, B., Yates, M., Rosales-Quintero, A., Virgen-Ortiz, J.J., Fernandez-Lafuente, R., Virgen-Ortiz, J.J., Fernandez-Lafuente, R., 2016. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. *RSC Adv.* 6, 100281–100294. <https://doi.org/10.1039/C6RA21730C>

- Tacias-Pascacio, V.G., Virgen-Ortíz, J.J., Jiménez-Pérez, M., Yates, M., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A., Fernandez-Lafuente, R., 2017. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. *Fuel* 200, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2017.03.054>
- Talasaz, A.A.H., Nemat-Gorgani, M., Liu, Y., Ståhl, P., Dutton, R.W., Ronaghi, M., Davis, R.W., 2006. Prediction of protein orientation upon immobilization on biological and nonbiological surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14773–14778. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605841103>
- Talukder, M.M.R., Wu, J.C., Van Nguyen, T.B., Fen, N.M., Melissa, Y.L.S., 2009. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 60, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.04.004>
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F., 2010. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 628–634. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.05.012>
- Tanaka, T., 2019. Enzyme applications in food processing: Traditional uses to new developments, *Encyclopedia of food chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21605-3>
- Teixeira, A.R.S., Santos, J.L.C., Crespo, J.G., 2011. Production of steryl esters from vegetable oil deodorizer distillates by enzymatic esterification. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 2865–2875. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ie1020766>
- Terada, O., Uwajima, T., 1977. Process for the preparation of cholesterol esterase. US4011138 A.
- Thangaraj, B., Jia, Z., Dai, L., Liu, D., Du, W., 2016. Lipase NS81006 immobilized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for biodiesel production. *Ovidius Univ. Ann. Chem.* 27, 13–21. <https://doi.org/10.1515/auoc-2016-0008>
- Thompson, G., Grundy, S.M., 2005. History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. *Am. J. Cardiol.* 96, 3–9. <https://doi.org/10.1016/J.AMJCARD.2005.03.013>

- Tôke, E.R., Nagy, V., Recseg, K., Szakács, G., Poppe, L., 2007. Production and application of novel sterol esterases from *Aspergillus* strains by solid state fermentation. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 907–915. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1127-4>
- Torrelo, G., Torres, C.F., Reglero, G., 2012. Enzymatic strategies for solvent-free production of short and medium chain phytosteryl esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114, 670–676. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100346>
- Torres-Salas, P., del Monte-Martinez, A., Cutiño-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A.O., Plou, F.J., Monte-Martinez, A., Cutino-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A.O., Plou, F.J., del Monte-Martinez, A., Cutiño-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A.O., Plou, F.J., 2011a. Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding enzymes to supports. *Adv. Mater.* 23, 5275–5282. <https://doi.org/10.1002/adma.201101821>
- Torres-Salas, P., del Monte-Martinez, A., Cutiño-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A.O., Plou, F.J., Monte-Martinez, A., Cutino-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A.O., Plou, F.J., del Monte-Martinez, A., Cutiño-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A.O., Plou, F.J., 2011b. Immobilized biocatalysts: Novel approaches and tools for binding enzymes to supports. *Adv. Mater.* 23, 5275–5282. <https://doi.org/10.1002/adma.201101821>
- Tükel, S.S., Hürrem, F., Yildirim, D., Alptekin, Ö., 2013. Preparation of crosslinked enzyme aggregates (CLEA) of catalase and its characterization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 97, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.007>
- Tural, B., Özkan, N., Volkan, M., 2009. Preparation and characterization of polymer coated superparamagnetic magnetite nanoparticle agglomerates. *J. Phys. Chem. Solids* 70, 860–866. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2009.04.007>
- Vadivel, M., Babu, R.R., Arivanandhan, M., Ramamurthi, K., Hayakawa, Y., 2015. Role of SDS surfactant concentrations on the structural, morphological, dielectric and magnetic properties of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *RSC Adv.* 5, 27060–

27068. <https://doi.org/10.1039/c5ra01162k>
- Valero, F., 2012. Heterologous expression systems for lipases: a review, in: Sandoval, G. (Ed.), *Lipases and Phospholipases, Methods in Molecular Biology*. Humana Press-Springer, New York, pp. 161–178. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5\\_11](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_11)
- Vaquero, M.E., Barriuso, J., Martínez, M.J., Prieto, A., 2016. Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2047–2061. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7258-x>
- Vaquero, M.E., Barriuso, J., Medrano, F.J., Prieto, A., Martínez, M.J., 2015a. Heterologous expression of a fungal sterol esterase/lipase in different hosts: effect on solubility, glycosylation and production. *J. Biosci. Bioeng.* 120, 637–643. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2015.04.005>
- Vaquero, M.E., Prieto, A., Barriuso, J., Martínez, M.J., Martinez, M.J., 2015b. Expression and properties of three novel fungal lipases/sterol esterases predicted in silico: comparison with other enzymes of the *Candida rugosa*-like family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10057–10067. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6890-9>
- Vaquero Morales, M., 2015. Expresión heteróloga, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de la esteroles esterasa-lipasa de “*Ophiostoma piceae*” y de otras enzimas seleccionadas. Universidad Complutense de Madrid.
- Verger, R., 1997. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15, 32–38. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10064-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10064-0)
- Villars, P., Cenxual, K., 2008. Pearson’s crystal data crystal structure database for inorganic compounds. *Choice Rev. Online* 45.
- Villeneuve, P., Turon, F., Caro, Y., Escoffier, R., Baréa, B., Barouh, B., Lago, R., Piombo, G., Pina, M., 2005. Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 150–155. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2005.02.002>

- Viñambres, M., Filice, M., Marciello, M., 2018. Modulation of the catalytic properties of lipase B from *Candida antarctica* by immobilization on tailor-made magnetic iron oxide nanoparticles: The key role of nanocarrier surface engineering. *Polymers* (Basel). 8. <https://doi.org/10.3390/polym10060615>
- Virgen-Ortiz, J.J., Tacias-Pascacio, V.G., Hirata, D.B., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A., Fernandez-Lafuente, R., 2017. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Technol.* 96, 30–35. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2016.09.010>
- Vu, P.-L., Shin, J.-A., Lim, C.-H., Lee, K.-T., 2004. Lipase-catalyzed production of phytosteryl esters and their crystallization behavior in corn oil. *Food Res. Int.* 37, 175–180. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2003.11.005>
- Wang, J., Zhao, G., Jing, L., Peng, X., Li, Y., 2015. Facile self-assembly of magnetite nanoparticles on three-dimensional graphene oxide-chitosan composite for lipase immobilization. *Biochem. Eng. J.* 98, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.013>
- Wang, X., Dou, P., Zhao, P., Zhao, C., Ding, Y., Xu, P., 2009. Immobilization of lipases onto magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for application in biodiesel production. *ChemSusChem* 2, 947–950. <https://doi.org/10.1002/cssc.200900174>
- Weber, N., Weitkamp, P., Mukherjee, K.D., 2001a. Steryl and stanyl esters of fatty acids by solvent-free esterification and transesterification in vacuo using lipases from *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, and *Carica papaya*. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5210–5216. <https://doi.org/10.1021/jf0107407>
- Weber, N., Weitkamp, P., Mukherjee, K.D., 2001b. Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst. *J. Agric. Food Chem.* 49, 67–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf000830w>
- Weinberger, S., Pellis, A., Comerford, J.W., Farmer, T.J., Guebitz, G.M., 2018. Efficient physisorption of *Candida antarctica* lipase B on polypropylene beads and application

- for polyester synthesis. *Catalysts* 8, 369. <https://doi.org/10.3390/catal8090369>
- Widmann, M., Juhl, P.B., Pleiss, J., 2010. Structural classification by the lipase engineering database: a case study of *Candida antarctica* lipase A. *BMC Genomics* 11, 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-123>
- Wikmark, Y., 2015. Engineering *Candida antarctica* lipase A for enantioselective transformations in organic synthesis. Stockholm University.
- Wildman, R.E.C., Kelley, M., 2007. Nutraceuticals and Functional Foods. *Handb. nutraceuticals Funct. foods* 56, 1–21. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.1.163b>
- Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., Kim, W.S., 2015. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16, 23501. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>
- Xie, W., Huang, M., 2018. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto graphene oxide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite: Characterization and application for biodiesel production. *Energy Convers. Manag.* 159, 42–53. <https://doi.org/10.1016/J.ENCONMAN.2018.01.021>
- Xie, W., Ma, N., 2009. Immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. *Energy & Fuels* 23, 1347–1353. <https://doi.org/10.1021/ef800648y>
- Xu, J., Sun, J., Wang, Y., Sheng, J., Wang, F., Sun, M., 2014. Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. *Molecules* 19, 11465–11486. <https://doi.org/10.3390/molecules190811465>
- Xu, X., 2000. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102, 287–303. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1438-9312\(200004\)102:4<287::aid-ejlt287>3.3.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1438-9312(200004)102:4<287::aid-ejlt287>3.3.co;2-h)
- Yang, H., Zhang, W., 2019. Surfactant imprinting hyperactivated immobilized lipase as efficient biocatalyst for biodiesel production from waste cooking oil. *Catalysts* 9. <https://doi.org/10.3390/catal9110914>



- Yeniad, B., Naik, H., Heise, A., 2011. Lipases in polymer chemistry, in: Nyanhongo, G.S., Steiner, W., Gübitz, G. (Eds.), *Biofunctionalization of Polymers and Their Applications*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 69–95. [https://doi.org/10.1007/10\\_2010\\_90](https://doi.org/10.1007/10_2010_90)
- Zaak, H., Siar, E.-H., Kornecki, J.F., Fernandez-Lopez, L., Pedrero, S.G., Virgen-Ortíz, J.J., Fernandez-Lafuente, R., 2017. Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads. *Process Biochem.* 56, 117–123. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2017.02.024>
- Zdarta, J., Meyer, A., Jesionowski, T., Pinelo, M., 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts* 8. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>
- Zhang, P., Li, X., Zhao, Q., Liu, S., 2011. Synthesis and optical property of one-dimensional spinel  $\text{ZnMn}_2\text{O}_4$  nanorods. *Nanoscale Res. Lett.* 6, 323. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-323>
- Zhang, W., Yang, H., Liu, W., Wang, N., Yu, X., 2017. Improved performance of magnetic cross-linked lipase aggregates by interfacial activation: A robust and magnetically recyclable biocatalyst for transesterification of jatropha oil. *Molecules* 22, 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules22122157>
- Zhang, Y., Ge, J., Liu, Z., 2015. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. *ACS Catal.* 5, 4503–4513. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00996>
- Zhao, J., Niu, Y., Ren, B., Chen, H., Zhang, S., Jin, J., Zhang, Y., 2018. Synthesis of Schiff base functionalized superparamagnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  composites for effective removal of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution. *Chem. Eng. J.* 347, 574–584. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.151>
- Zheng, M.-M., Dong, L., Lu, Y., Guo, P.-M., Deng, Q.-C., Li, W.-L., Feng, Y.-Q., Huang, F.-H., 2012. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) polymer microsphere for synthesis of phytosterol esters of unsaturated fatty acids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 74, 16–23.

<https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2011.08.008>

Zheng, M.-M., Lu, Y., Huang, F.-H., Wang, L., Guo, P.-M., Feng, Y.-Q., Deng, Q.-C., 2013. Lipase immobilization on hyper-cross-linked polymer-coated silica for biocatalytic synthesis of phytosterol esters with controllable fatty acid composition. *J. Agric. Food Chem.* 61, 231–237. <https://doi.org/10.1021/jf3042962>

Zheng, M.M., Lu, Y., Dong, L., Guo, P.M., Deng, Q.C., Li, W.L., Feng, Y.Q., Huang, F.H., 2012. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. *Bioresour. Technol.* 115, 141–146.

Zucca, P., Sanjust, E., 2014. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules* 19, 14139–14194. <https://doi.org/10.3390/molecules190914139>







## Artículos y Patentes elaborados a partir de esta Tesis

1. Molina-Gutiérrez, M., Hakalin, N., Rodríguez-Sanchez, L., Prieto, A., Martínez, M.J., 2017. Green synthesis of  $\beta$ -sitostanol esters catalyzed by the versatile lipase/sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. Food Chem 221, 1458–1465.
2. Prieto Orzanco, A., Molina-Gutiérrez, M., Martínez Ferrer, A., Martínez Hernández, M.J., 2017. Síntesis de biodiesel catalizada por un crudo enzimático inmovilizado sobre partículas magnéticas, Patente, No. P201730855.
3. Prieto Orzanco, A., Molina-Gutiérrez, M., López Gómez, F.A., García Díez, I., Alcaraz Romo, L. y Martínez Hernández, M.J., 2019. Catalizador biológico reciclable obtenido a partir de masa negra de pilas desechadas para la síntesis de ésteres alquílicos de ácidos graso volátiles, Patente, No. P201930303.
4. Molina-Gutiérrez, M., Hakalin, N., Rodríguez-Sanchez, L., Alcaraz Romo, L., López, F.A., Martínez, M.J., Prieto, A., 2019. Effect of the immobilization strategy on the efficiency and recyclability of the versatile lipase from *Ophiostoma piceae*. Molecules 24, 1313.

